

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

ALTERACIONES DEL HIPOCAMPO ESCLERÓTICO Y DE LA CORTEZA TEMPORAL
ADYACENTE EN PACIENTES CON EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL

Asta Kastanauskaite

Tesis Doctoral 2009

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencias

Memoria para optar al grado de Doctor en Neurociencia presentada por

Asta Kastanauskaite

Realizada en el Instituto Cajal (CSIC) bajo la dirección del Dr. Javier de Felipe Oroquieta
y de la Dra. Lidia Alonso Nanclares

VºBº de los directores de la Tesis

Fdo. Dr. Javier de Felipe Oroquieta

Fdo. Dra. Lidia Alonso Nanclares

VºBº de la tutora

La interesada

Fdo. Dra. Carmen de la Roza Ruiz

Fdo. Asta Kastanauskaite

El Dr. Javier de Felipe Oroquieta, profesor de investigación del Instituto Cajal del CSIC y la Dra. Lidia Alonso Nanclares, investigadora contratada del Instituto Cajal del CSIC,

HACEN CONSTAR:

Que Asta Kastauskaite ha realizado bajo su dirección el trabajo de su Tesis Doctoral “ALTERACIONES DEL HIPOCAMPO ESCLERÓTICO Y DE LA CORTEZA TEMPORAL ADYACENTE EN PACIENTES CON EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL” que ha llevado a cabo con el mayor aprovechamiento.

Revisado el presente trabajo, queda conforme con su presentación para ser juzgado.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firman en Madrid a 9 de junio de 2009,

Fdo. Dr. Javier de Felipe Oroquieta

Fdo. Dra. Lidia Alonso Nanclares

Agradecimientos

Quiero recordar a todos que de una manera u otra ha participado en la realización de esta tesis doctoral:

Al coordinador del programa de Neurociencias en la Universidad de Vilnius, mi profesor Dr. Osvaldas Ruksenas, que inició el programa de Neurobiología en la Universidad de Vilnius y allí estuve yo, muy interesada en “que es lo que pasa dentro de la cabeza de cada uno”.

Quiero agradecer a Javier de Felipe y Lidia Alonso por dirigirme de una manera sencilla en este mundo tan especial y ayudar a llevar a cabo la difícil tarea - escribir la tesis.

Al Dr. Rafael García de Sola y a todo el equipo de la unidad de Neurocirugía del Hospital de la Princesa de Madrid que me ha proporcionado el material de experimentación para llevar a cabo esta tesis.

A mis compañeros y ex compañeros – otra vez Lidia Alonso, Ruth, Paula, Virginia, Lidia Blázquez, Miguel, Alberto, Rodrigo, Ángel, Juncal, Ana, Isabel, Jon, Azucena, Inma, Shira, Rufino, Nuria y Mari Carmen por apoyo y ayuda.

Además gracias a las chicas de administración, a los del servicio técnico y almacén, los informáticos, las de la biblioteca....

A mi amigo Tomás, mi alma gemela.

A mis amigos, Lenka, Valeria, Valera, Katia, Vitalia, Grisel, Victor y Victoria que me han dado mucha alegría durante los años de la tesis.

A mis padres que me han educado y me han dado lo mejor que tenían, a mi hermana Dalia que siempre me dio mucha alegría.

A mi hijo Deividas y mi pareja Aliaksandr mantener mi animo y por aguantarme.

A mi nueva familia de parte de mi pareja, Oksana, Boris, Zhenia, Bosik.

A mis vecinos Antonia y Francisco.

A Deividas y a Aleksandr

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CORTEZA TEMPORAL: Localización y citoarquitectura	3
1.2. FORMACIÓN DEL HIPOCAMPO	5
1.2.1. Anatomía y nomenclatura	5
1.2.2. Citoarquitectura de la formación del hipocampo	7
1.2.3. Conexiones intrínsecas y extrínsecas de la formación del hipocampo	9
1.2.4. Organización sináptica del hipocampo	11
1.2.5. Vascularización del hipocampo	12
1.2.5.1. <i>Marcaje de la vascularización</i>	13
1.3. EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL (ELT)	15
1.4. ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO	18
1.4.1. Histopatología de la esclerosis del hipocampo y epileptogenicidad	18
1.4.1.1. <i>Alteraciones vasculares</i>	18
1.4.1.2. <i>Modificación de los circuitos sinápticos</i>	20
1.4.1.3. <i>Alteraciones en los sistemas de neurotransmisores</i>	21
1.4.2. Relación entre esclerosis del hipocampo y crisis epilépticas	22
1.5. ALTERACIONES EN LA CORTEZA LATERAL DE PACIENTES CON ELT	25
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. OBTENCIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL HUMANO	35
3.2. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO	37
3.3. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DEL HIPOCAMPO	37
3.4. TINCIÓN HISTOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE LA AP	38
3.4.1. Análisis cuantitativo	38
3.5. INMUNOHISTOQUÍMICA	40
3.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	40
3.7. ESTIMACIÓN DE LA FRACCIÓN DE VOLUMEN DE LOS VASOS SANGUÍNEOS	41
3.8. ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD SINÁPTICA	42
4. RESULTADOS	45
4.1. ESTUDIO DE LA VASCULARIZACIÓN DEL HIPOCAMPO	47
4.1.1. Análisis de la microvascularización mediante el marcaje para la AP	47
4.1.2. Análisis de la microvascularización mediante el marcaje para colágeno-IV	48
4.1.3. Estimación de la fracción de volumen de los vasos sanguíneos	54
4.1.4. Análisis ultraestructural de la vascularización	54
4.2. ESTUDIO DE LOS CIRCUITOS SINÁPTICOS EN EL HIPOCAMPO	58
4.2.1. Análisis histopatológico del hipocampo	58
4.2.2. Estudio de la ultraestructura y morfología de los contactos sinápticos	61
4.2.3. Longitud de los contactos sinápticos	63
4.2.4. Determinación de la densidad sináptica	64

4.3. ALTERACIONES DE LA CORTEZA TEMPORAL DE PACIENTES CON ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO.....	67
4.3.1. Pérdida neuronal.....	71
4.3.2. Alteraciones citoarquitectónicas.....	73
4.3.3. Presencia de <i>corpora amilacea</i>	73
4.3.4. Alteraciones vasculares.....	73
4.3.5. Relación entre las alteraciones microscópicas y evaluación postquirúrgica.....	74
5. DISCUSIÓN.....	77
5.1. ALTERACIONES DE LA VASCULARIZACIÓN DEL HIPOCAMPO DE PACIENTES CON ELT.....	79
5.1.1. Relación entre pérdida neuronal y vasos sanguíneos.....	80
5.2. CAMBIOS DE LOS CIRCUITOS SINÁPTICOS EN EL HIPOCAMPO DE PACIENTES CON ELT.....	82
5.3. HISTOPATOLOGÍA DE LA CORTEZA TEMPORAL DE PACIENTES CON ELT Y ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO.....	84
5.3.1. Pérdida neuronal.....	85
5.3.2. Alteraciones citoarquitectónicas.....	87
5.3.3. Exceso de <i>corpora amilacea</i>	87
5.3.4. Alteraciones vasculares.....	88
5.3.5. Relación entre alteraciones microscópicas de la corteza lateral y epileptogénesis.....	89
6. CONCLUSIONES.....	93
7. BIBLIOGRAFÍA.....	97
8. ANEXO: Publicaciones científicas.....	115
8.1. MACROANATOMY AND MICROANATOMY OF THE TEMPORAL LOBE. Semin Ultrasound CT MRI (2007) 28:404-415.....	117
8.2. ALTERATIONS OF THE MICROVASCULAR NETWORK IN THE SCLEROTIC HIPPOCAMPUS FROM EPILEPTIC PATIENTS. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology (2009), en prensa.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: complejo avidina-biotina;
AP: fosfatasa alcalina;
AP-KO: modelo de ratón que no expresa AP, del inglés “*alkaline phosphatase knock out*”;
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato;
BDP: ftalato de dibutilo;
BDMA: bencil dimetil amina;
CA1-CA3: campos del asta de Ammón (o amónicos);
CLG-IV: colágeno de tipo 4;
DAB: 3,3'-diaminobenzidino tetrahydrochlorida;
DDSA: dodecenil succinil anhídrido;
DePeX: mezcla de isómeros, para medio de montaje;
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético;
EEG: electroencefalografía;
ELT: epilepsia del lóbulo temporal;
EPO-R: receptor de eritropoyetina;
ETM: esclerosis temporal mesial;
GABA: ácido gamma-aminobutírico;
GAD: glutamato decarboxilasa, enzima de síntesis de GABA;
GAT-1: transportador de GABA de tipo I;
GD: giro dentado;
GFAP: proteína ácida fibrilar glial;
Ir: inmunoreactivo;
KCC2: cotransportador de K^{+} - Cl^{-} ;
LN3: antígeno de leucocitos humanos, marcador de microglía activada;
 $MgCl_2$: cloruro de magnesio;
MRI: resonancia magnética;
NaCl: cloruro de sodio;
NADPH-diaforasa: enzima nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato-diaforasa;
NBT: cloruro de nitrotetrazolio
NeuN: proteína específica nuclear de neurona;
NKCC: cotransportador de Na^{+} - K^{+} - $2Cl^{-}$;
 N_V : número de sinapsis por volumen;
PB: tampón fosfato;
PLP: piridoxal-5'-fosfato;
PV: parvoalbúmina;
Tie2: marcador de endotelio vascular, relacionado con procesos de angiogénesis;
Tris-HCl: tampón tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreuro,
VGAT: transportador vesicular de GABA;
VGluT-1: transportador vesicular de glutamato de tipo I;
 V_V : fracción de volumen.

INTRODUCCIÓN

1.1. CORTEZA TEMPORAL: Localización y citoarquitectura

La corteza temporal humana está situada en la parte más externa del lóbulo temporal, que se encuentra en la cara lateral de los hemisferios cerebrales. Está delimitada dorsalmente por la cisura de Silvio, posteriormente por la corteza preoccipital (área 19 de Brodmann; Garey, 1994) y por las áreas parietales angular y supramarginal (39 y 40 de Brodmann). Engloba los giros temporales superior, medio e inferior. Es la región más extensa de la corteza después de la frontal, y

constituye un 20% de la superficie cortical total (Bailey y Von Bonin, 1951). Se considera una región principalmente de asociación y está implicada en funciones cerebrales superiores relacionadas con la integración de estímulos sensoriales, consolidación de la memoria y funciones afectivas. En el presente estudio nos centraremos en los giros inferior y medio (Fig. 1A).

Citoarquitectónicamente se denomina NEOCORTEZA (o isocorteza), y se organiza en 6 capas que se diferencian por la densidad y tipos de células que presentan. Estas capas

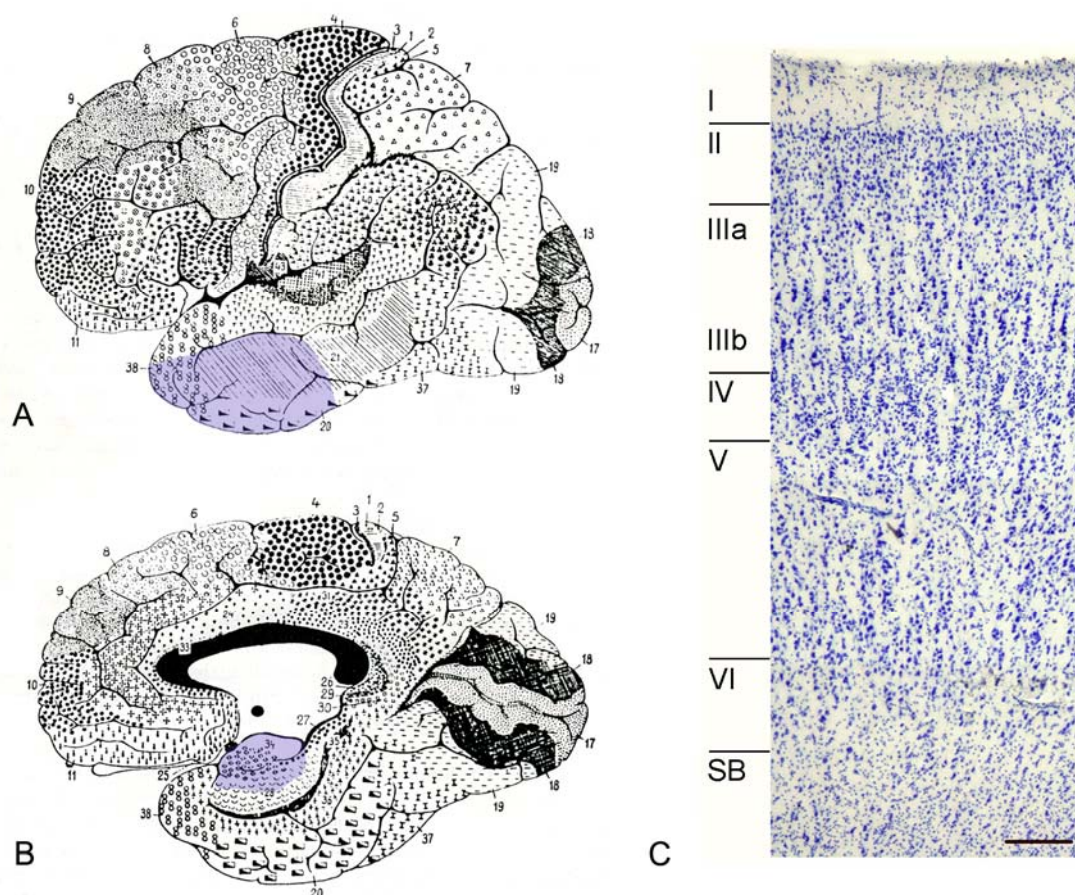


Fig. 1. Divisiones citoarquitectónicas de la neocorteza humana. **A:** Vista lateral; **B:** Vista mesial de la corteza cerebral. Tomado de Brodmann (1909). En azul se indican las áreas estudiadas en el presente trabajo. **C:** Microfotografía de una sección de 100 µm de grosor de la corteza temporal humana (área 20 de Brodmann), en la que se indican las capas corticales. SB, sustancia blanca. Barra de escala: 200 µm.

se numeran de la I a la VI, siendo la I la más externa y la VI la más profunda, contigua a la sustancia blanca (Fig. 1C). Básicamente, las características citoarquitectónicas de estas capas son:

Capa I (o molecular): presenta una densidad celular muy baja.

Capa II: muestra una densidad muy alta de células piramidales pequeñas (6-8 μm de diámetro).

Capa III: se diferencian dos subcapas, la IIIa o superficial, presenta células piramidales pequeñas (8-10 μm); y la IIIb o profunda, que está formada por células piramidales grandes (15-25 μm).

Capa IV: presenta una alta densidad celular y está poblada mayoritariamente por células estrelladas pequeñas (8 μm).

Capa V: presenta células piramidales de tamaño medio y grande (10-25 μm).

Capa VI (o polimórfica): está formada por neuronas morfológicamente heterogéneas.

La aplicación del método de Golgi al estudio de la microanatomía de la corteza cerebral permitió la visualización de las neuronas en detalle (Golgi, 1873). Estos estudios hicieron posible la clasificación de los diferentes tipos de neuronas presentes en la corteza según sus características morfológicas (Fig. 2). Utilizando este método Santiago Ramón y Cajal clasificó las neuronas corticales en dos grupos básicos: células de axón largo y células de axón corto (Cajal, 1892; revisado en DeFelipe, 2002).

Desde entonces se reconocen dos grupos neuronales bien diferenciados: las células de axón largo o de proyección, que corresponden principalmente a las células piramida-

les, y las células de axón corto o interneuronas.

Células piramidales: son las neuronas más abundantes de la corteza cerebral (representan un 70-85 % de la población neuronal total). Están presentes en todas las capas corticales excepto en la capa I y constituyen la mayoría de las células de proyección. Utilizan el glutamato como neurotransmisor y son excitadoras (Conti *et al.*, 1987; DeFelipe *et al.*, 1988). Presentan un soma de forma piramidal del que surge una dendrita apical, orientada hacia superficie de la corteza, y, radialmente, surgen las dendritas basales. Toda la superficie de las dendritas está cubierta de espinas dendríticas, excepto las 10-20 μm proximales (Alonso-Nanclares *et al.*, 2004). El axón surge directamente desde el soma o bien de la parte proximal de una dendrita basal, proyecta a larga distancia y da lugar a una arborización axónica intracortical.

Interneuronas: se caracterizan por poseer un axón que se ramifica localmente, por lo que también se denominan células de axón local o de axón corto. Tras los estudios pioneros sobre la morfología de estas células realizados por Cajal utilizando el método de Golgi (Cajal, 1899; revisado en Fairén *et al.*, 1984; Lund *et al.*, 1984; Peters y Jones, 1984; White, 1989; DeFelipe, 2002), se estableció una clasificación basada en la presencia de espinas dendríticas, que las divide básicamente en dos grandes grupos:

-Interneuronas con espinas: se localizan en capas medias de la corteza y presentan frecuentemente una morfología somato-

dendrítica estrellada, por lo que se denominan neuronas estrelladas con espinas. Estas células son excitadoras y usan el glutamato como neurotransmisor.

-Interneuronas sin espinas, constituyen la mayoría de las neuronas de axón local y representan un 15-30% de la población neuronal. Incluyen una gran variedad de tipos morfológicos con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes cuya clasificación todavía está sometida a un intenso debate (DeFelipe, 1993a; revisado en Ascoli *et al.*, 2008). Mayoritariamente utilizan el ácido γ -amino-butírico (GABA) como neurotransmisor (revisado en Houser *et al.*, 1984)

siendo por tanto, inhibitorias (Peters *et al.*, 1990; Gonchar *et al.*, 1995; Fabri y Manzoni, 1996).

1.2. FORMACIÓN DEL HIPOCAMPO

1.2.1. Anatomía y nomenclatura

La formación del hipocampo se sitúa en la cara medial del lóbulo temporal (Fig. 1B), adyacente al asta ventral del ventrículo lateral y hace referencia al conjunto formado por el giro dentado (GD), el hipocampo propio (CA1-3), el complejo subicular y la corteza entorrinal (Fig. 3). Estas estructuras se agrupan por su proximidad y por su estrecha

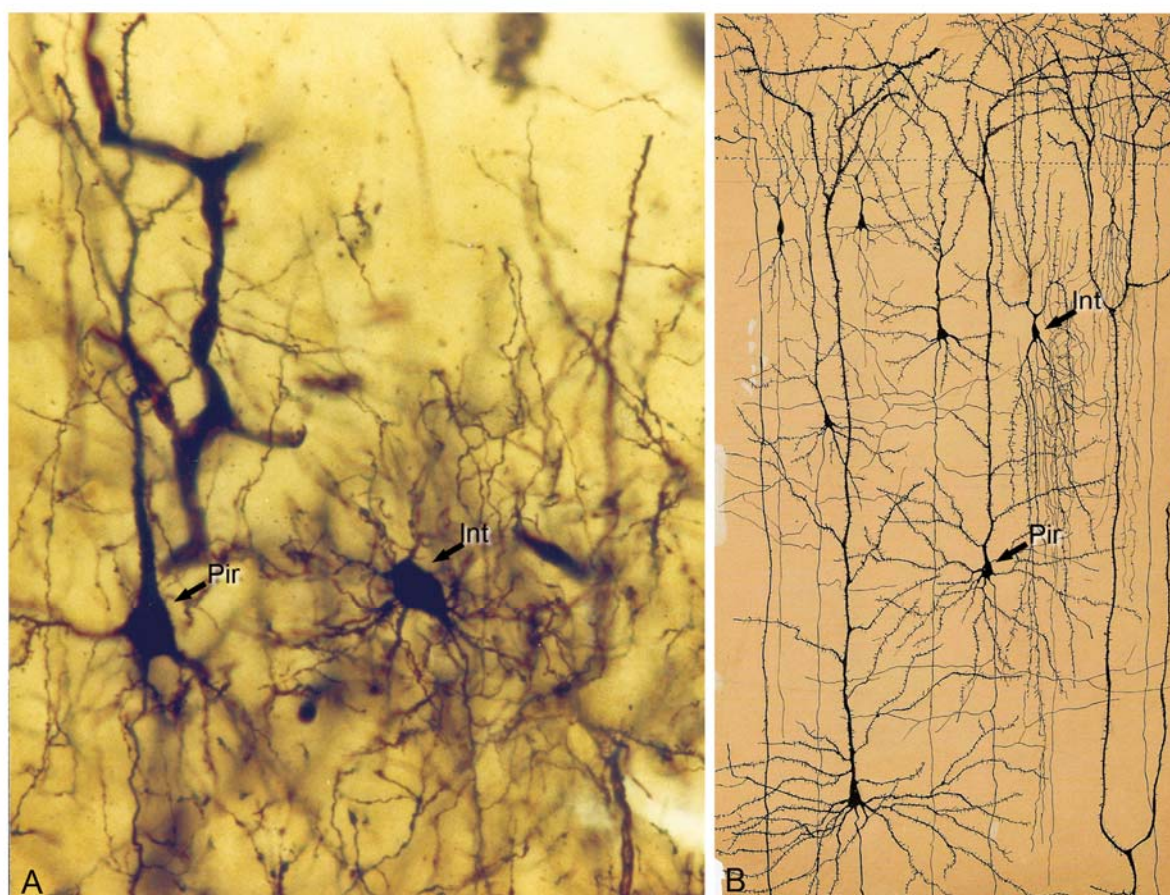


Fig. 2. Microfotografía una preparación original de Cajal (A), donde las células se visualizan mediante el método de Golgi. Dibujo esquemático de neuronas de la corteza cerebral humana (B), realizado por Cajal (1899) utilizando preparaciones teñidas mediante el método de Golgi. Pir, célula piramidal, Int: interneurona.

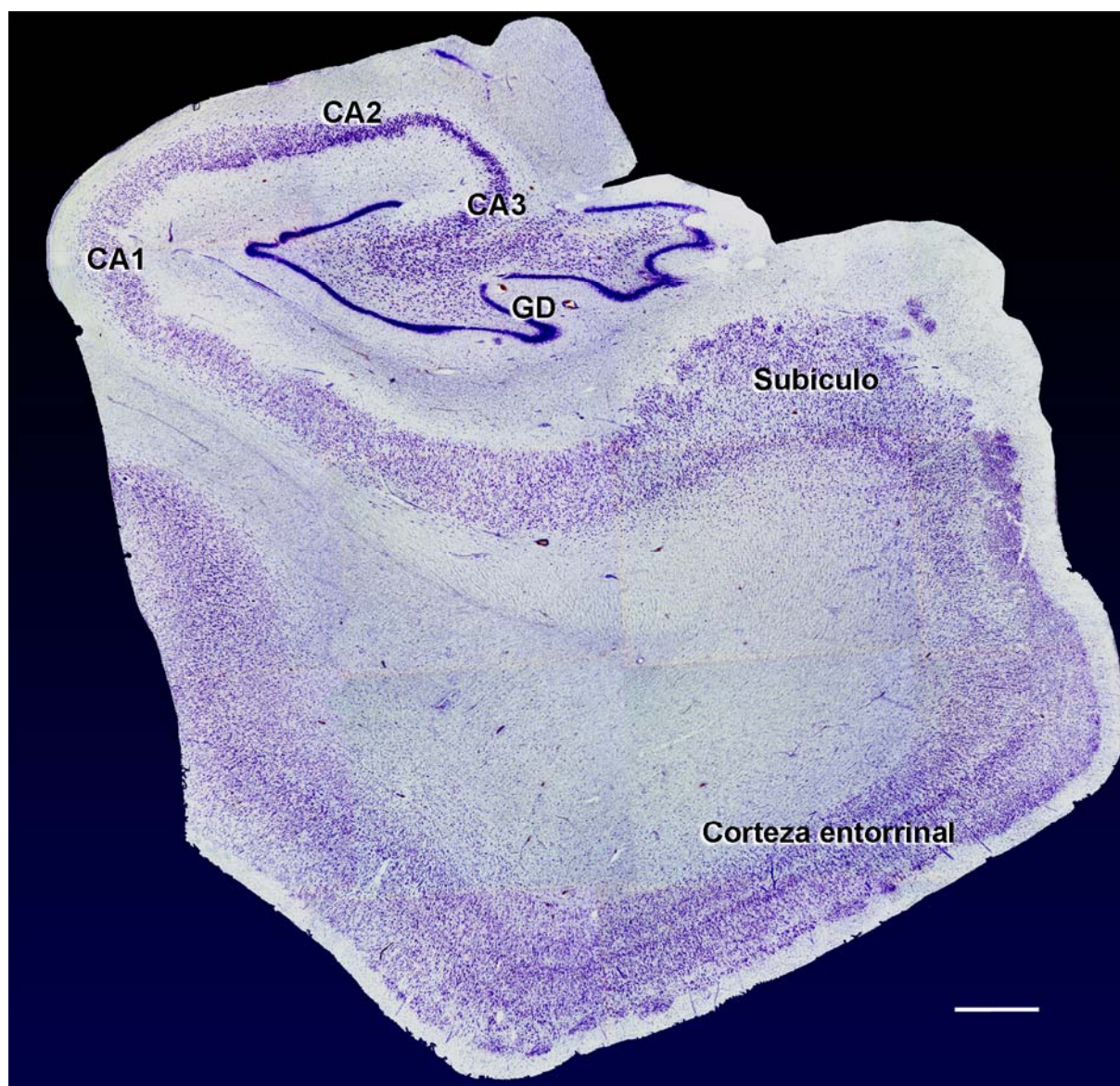


Fig. 3. Microfotografía panorámica de la formación del hipocampo humano, teñida con el método de Nissl. CA1-3: campos amigdalinos (*cornu ammonis*); GD: giro dentado. Barra de escala: 1000 μ m.

relación funcional (Amaral e Insausti, 1990; Duvernoy, 1998).

Desde que en 1587 Julius Caesar Arantius realizó la primera descripción anatómica de esta estructura, a la que denominó hipocampo por su parecido a un caballito de mar, la nomenclatura de esta parte del cerebro ha presentado un cierto grado de ambigüedad (Lewis, 1923). La ausencia de ilustraciones claras que apoyaran este planteamiento inicial motivó que su anatomía no resultara del todo clara para autores posteriores. Así,

Winslow (Winslow, 1732) lo describió como un cuerno de carnero, y DeGarengeot (DeGarengeot, 1742) precisó que estos cuernos eran como los del dios egipcio Ammón (por lo que se denominó en castellano “asta de Ammón”). En 1895 la *Nomina Anatomica* eligió el término *hippocampus* para identificar esta estructura (revisado en Lewis, 1923; Gross, 1993; Olry y Haines, 1998).

El término “asta de Ammón” se mantuvo para definir los campos de células piramidales que se encuentran entre el giro dentado y

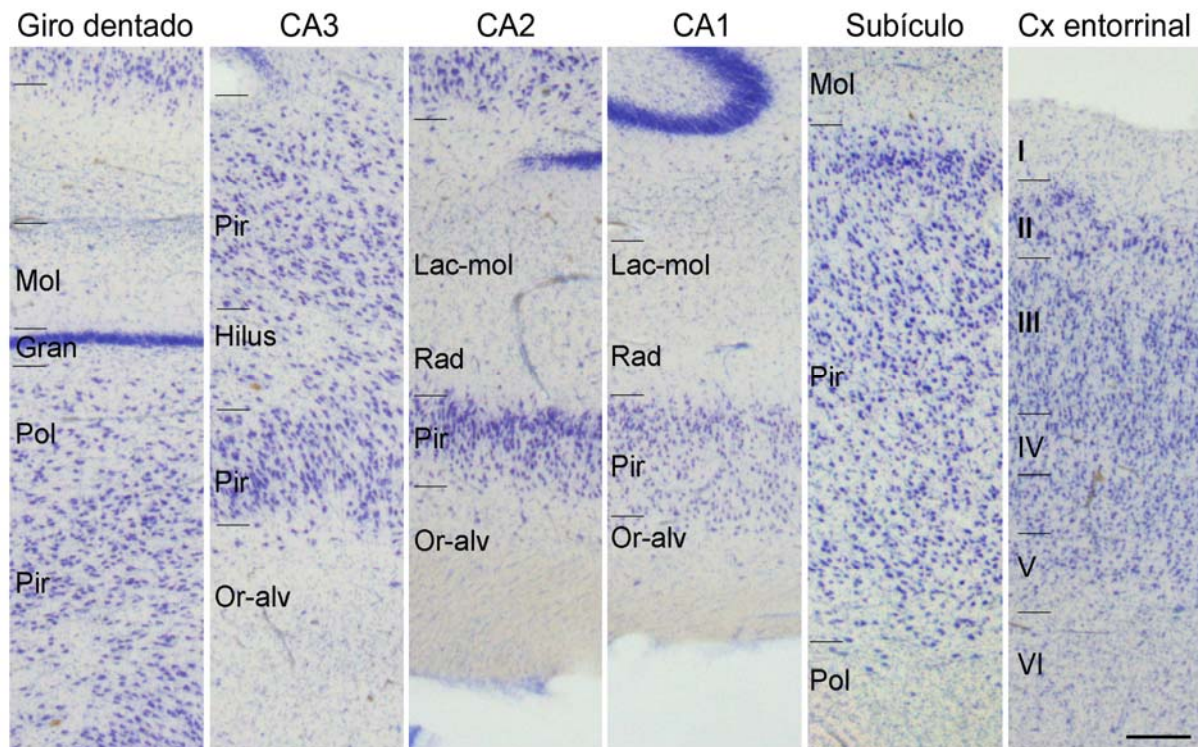


Fig. 4. Citoarquitectura de los distintos campos de la formación de hipocampo. Giro dentado, CA y subículo se clasifican como arquicorteza. La corteza entorrinal se considera mesocorteza y presenta una laminación más compleja, en la que se distinguen 6 capas más o menos diferenciadas. Mol: capa molecular; Gran: capa granular; Pol: capa polimorfa; Lac-mol: estratos *lacunosum* y *molecularis*; Rad: estrato *radiatum*; Pir: estrato *piramidale*; Or-alv: estratos *oriens* y *alveus*. Barra de escala: 320 μ m.

el subículo (Braak, 1980, Rosene y Van Hoesen, 1987). En el presente estudio el término “hipocampo propio” se refiere al asta de Ammón, mientras que el término “formación del hipocampo” engloba el hipocampo, el complejo subicular y la corteza entorrinal.

1.2.2 Citoarquitectura de la formación del hipocampo

Citoarquitectónicamente, la formación del hipocampo está compuesta por dos tipos de corteza: arquicorteza y mesocorteza (Fig. 4; DeFelipe *et al.*, 2007).

ARQUICORTEZA: se encuentra en el giro dentado, el hipocampo propio y el subículo, y contiene, a su vez, tres capas:

Capa molecular: contiene las dendritas de

las células del estrato celular, axones aferentes procedentes de otras regiones y algunas neuronas polimórficas.

Capa celular: compuesta mayoritariamente por neuronas granulares en el giro dentado, y células piramidales en el hipocampo propio y subículo. Estas neuronas de la capa celular se denominan células principales.

Capa polimorfa: contiene principalmente los axones de células principales, un número variable de células polimórficas y axones aferentes.

La citoarquitectura del hipocampo propio o asta de Ammón, presenta además estratos bien diferenciados, y fue descrita en el año 1893 por Ramón y Cajal (Cajal, 1893). Estos estratos se corresponden con las tres capas típicas de la arquicorteza, considerando

los estratos *radiatum* y *lacunosum-moleculare* como la capa molecular, el estrato *piramidale* como la capa celular, y los estratos *oriens* y *alveus* como la capa polimorfa (Fig. 4; Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934), considerando desde la cisura del hipocampo a la superficie ventricular (Duvernoy, 1998):

-*Lacunosum-moleculare*: contiene las arborizaciones distales de las dendritas apicales de las células piramidales, y fascículos axonales que discurren paralelos a la cisura hipocámpica. Estos fascículos están formados principalmente por fibras perforantes procedentes de la corteza entorrinal. También contiene algunas interneuronas.

-*Radiatum*: contiene las dendritas apicales de las células piramidales, los axones aferentes que contactan con ellas y algunas interneuronas.

-*Piramidale*: está compuesto principalmente por somas de células piramidales, que son neuronas con espinas de tamaño medio y grande, y la mayoría de las interneuronas hipocámpicas.

-*Oriens*: contiene los axones de las células piramidales, junto con algunas neuronas polimórficas.

-*Alveus*: es un fascículo formado por axones eferentes de las neuronas principales del asta de Ammón y del subículo, y por fibras aferentes de origen subcortical.

El hipocampo propio es heterogéneo en su distribución medio-lateral, por lo que se han propuesto distintas divisiones regionales. La nomenclatura más comúnmente empleada es la de Lorente de Nó (Lorente de Nó, 1934), que diferencia cuatro campos del asta de

Ammón o *cornu ammonis* (CA; Fig. 4.). Sin embargo, existen algunas discordancias en la delimitación y nomenclatura de los campos ammónicos. Algunos autores (Braak, 1980; Rosene y Van Hoesen, 1987; Duvernoy, 1998) distinguen el campo CA4, basándose en las diferencias citoarquitectónicas con CA3. Otros autores consideran que no existen diferencias significativas en las características citoarquitectónicas o conexiones entre ambos campos, por lo que denominaban el conjunto como CA3 (Brown y Zador, 1990; Amaral y Insausti, 1990; Witter y Amaral, 1991), en el presente trabajo hemos utilizado esta última nomenclatura. CA2 se caracteriza por poseer un estrato piramidal especialmente estrecho y densamente poblado por células piramidales grandes. CA1 se sitúa adyacente a CA2, y se extiende ventral y medialmente, rodeando la cisura hipocámpica, hasta el subículo. Las células son más pequeñas que las de CA2, y se encuentran mucho más dispersas que en los campos CA2 y CA3.

El complejo subicular se sitúa adyacente al extremo medial de CA1 y se compone del subículo, presubículo y parasubículo. La diferencia entre subículo y CA1 se establece por la presencia de pequeñas agrupaciones de células piramidales. El subículo se caracteriza por presentar células piramidales grandes y porque el lugar del estrato *oriens* está ocupado por una capa densamente poblada de células piramidales pequeñas, que dan paso a neuronas fusiformes en el límite con la sustancia blanca subyacente (Fig. 4). El subículo es una zona de transición entre el hipocampo propio y la corteza entorrinal, y representa la mayor estructura de salida

del hipocampo (Finch y Babb, 1981; Witter *et al.*, 1989; Cavazos *et al.*, 2004; revisado en Stafstrom, 2005).

MESOCORTEZA: se encuentra en la corteza entorrinal, y es una corteza de transición entre arquicorteza y neocorteza (Amaral *et al.*, 1987; Insausti *et al.*, 1995). También se denomina perialocorteza, y se organiza básicamente en seis capas celulares más o menos diferenciadas (Fig. 4). La corteza entorrinal se encuentra en la porción rostral del giro parahipocámpico. Limita lateralmente con la corteza perirrinal y mesialmente con la corteza periamigdalina en niveles rostrales y con el complejo subicular en niveles medios y caudales. Presenta una laminación de seis capas, con agrupaciones de células piramidales en capa II.

1.2.3. Conexiones intrínsecas y extrínsecas de la formación del hipocampo

La mayor parte de la información sobre las conexiones del hipocampo se ha obtenido a partir de estudios realizados en rata, gato y mono (Witter *et al.*, 1989), esto se debe a que no existen métodos adecuados para el estudio de estas conexiones en el tejido humano obtenido *postmortem*. A continuación, se describen brevemente las conexiones de la formación del hipocampo cuya posible homología con los circuitos humanos aun está por confirmar.

Básicamente, el hipocampo presenta una serie de conexiones intrínsecas, muy ordenadas y distribuidas en serie que unen los campos adyacentes (Figs. 5, 6; Cajal, 1901; Amaral y Insausti, 1990; revisado en Duver-

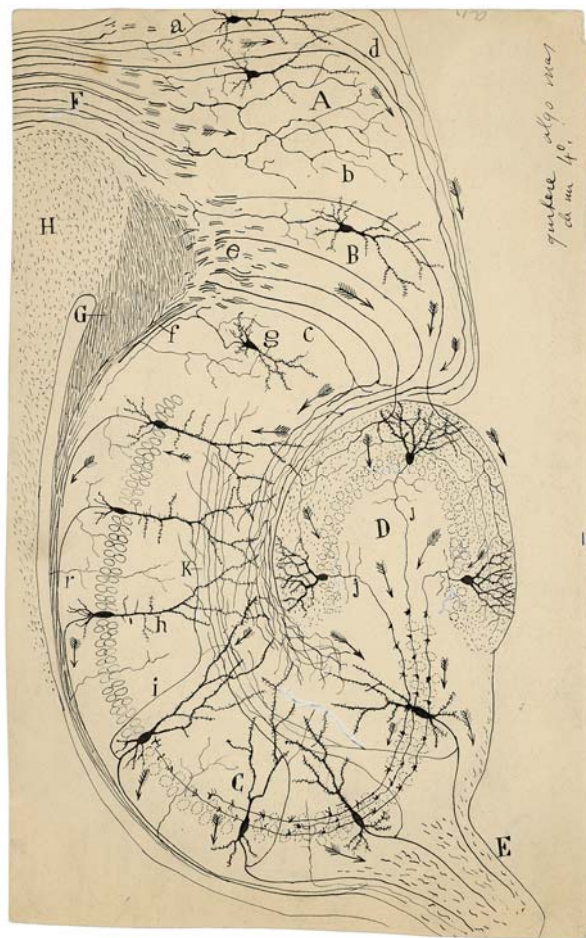


Fig. 5. Dibujo esquemático de la estructura y conexiones del hipocampo propio. Tomado de Cajal, 1901.

noy, 1998). La principal vía de conexión entre los componentes de la formación del hipocampo fue inicialmente denominada vía trisináptica (Andersen *et al.*, 1966). Esta vía se caracteriza por contar con un circuito básico formado por la vía perforante, la vía musgosa y las colaterales de Schaffer (Schaffer, 1892). Actualmente, este esquema ha sido completado con otras conexiones, por lo que algunos autores la denominan vía polisináptica (Duvernoy, 1998). Esta vía se caracteriza por presentar conexiones excitadoras (glutamatérgicas) en todos los pasos y una marcada direccionalidad, con muy poca recurrencia (Fig. 6; Amaral e Insausti, 1990).

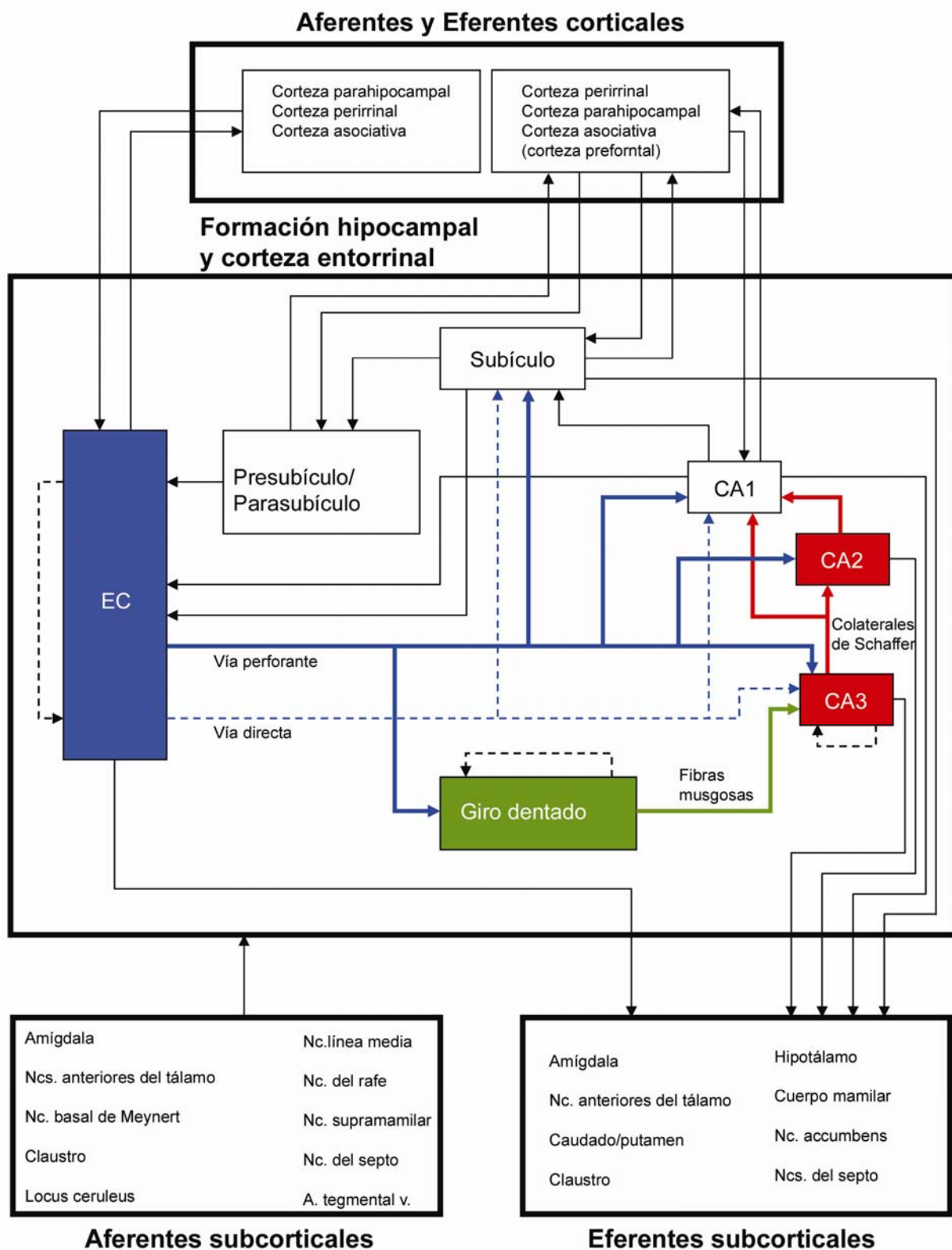


Fig. 6. Esquema de las principales conexiones intrínsecas de la formación del hipocampo y la corteza entorrinal (EC), así como de las principales conexiones aferentes y eferentes corticales y subcorticales. Las líneas discontinuas en el giro dentado, CA3 y corteza entorrinal indican las conexiones entre diferentes regiones en cada una de estas áreas. Basado en las revisiones de Gloor, 1997; Insausti y Amaral, 2004.

Además, existen circuitos intrínsecos compuestos por interneuronas inhibitorias. Estas interneuronas regulan los circuitos hipocámpales, y presentan diferentes neurotransmisores, siendo el más abundante el GABA.

En cuanto a las conexiones extrínsecas, la formación del hipocampo presenta conexiones con múltiples áreas corticales y subcorticales (Fig. 6; DeFelipe *et al.*, 2007). Básicamente, las entradas de información cortical suponen el principal componente de las aferencias que llegan a la formación del hipocampo (Rosene y Van Hoesen, 1987; Witter *et al.*, 1989). La información cortical entra en la formación del hipocampo a través de la corteza entorrinal, que recibe aferencias desde diversas regiones del sistema límbico y áreas de asociación, además, estas conexiones son recíprocas (Insausti *et al.*, 1987; Witter *et al.*, 1989; Amaral y Insausti, 1990).

El subículo recibe proyecciones de CA1, y envía proyecciones a áreas límbicas y extralímbicas, y es la estructura cerebral que codifica la actividad neuronal procedente del hipocampo propio. Por su localización, el subículo puede modificar y modular las descargas neuronales procedentes del hipocampo y su salida hacia otras áreas corticales y subcorticales (Stafstrom, 2005). Los axones que abandonan el subículo alcanzan principalmente la corteza temporal inferior, la punta del lóbulo temporal y la corteza prefrontal (Rosene y Van Hoesen, 1987). También existen proyecciones directas desde CA1 a la corteza frontal (Cavada *et al.*, 2000).

1.2.4. Organización sináptica del hipocampo

Los primeros estudios de la corteza cerebral revelaron, mediante microscopía electrónica, la existencia de dos tipos de sinapsis denominadas tipo I y tipo II (Gray, 1959a, b), o sinapsis asimétricas y simétricas, respectivamente (Colonnier, 1968). Las sinapsis asimétricas se caracterizan principalmente por presentar una prominente banda de material electrodensito en la cara citoplasmática de la membrana postsináptica, de 40-50 nm de grosor. Las sinapsis simétricas se caracterizan por tener una delgada densidad postsináptica (aproximadamente de 10 nm) de manera que las membranas pre y postsináptica tienen un grosor similar (Fig. 7). Se considera que las sinapsis asimétricas son excitadoras y usan glutamato como neurotransmisor (Gilbert, 1983; White, 1989; DeFelipe *et al.*, 1988; Conti *et al.*, 1989; Conti *et al.*, 1987; DeFelipe y Farinas, 1992). Las sinapsis simétricas son inhibitorias y, en general, usan GABA como neurotransmisor (Houser *et al.*, 1984; DeFelipe y Farinas, 1992).

Estudios cuantitativos en la neocorteza temporal humana realizados mediante microscopía electrónica, han demostrado que la mayoría de las sinapsis son asimétricas (89 %) mientras que el resto (11 %) son simétricas (DeFelipe *et al.*, 2002). Sin embargo, los estudios cuantitativos realizados en el hipocampo de rata y ratón, indican que, aunque la mayoría de las sinapsis del hipocampo son asimétricas, el porcentaje de sinapsis simétricas es más alto que en otras regiones de la corteza, y varía según los estratos (Megías *et al.*, 2001).

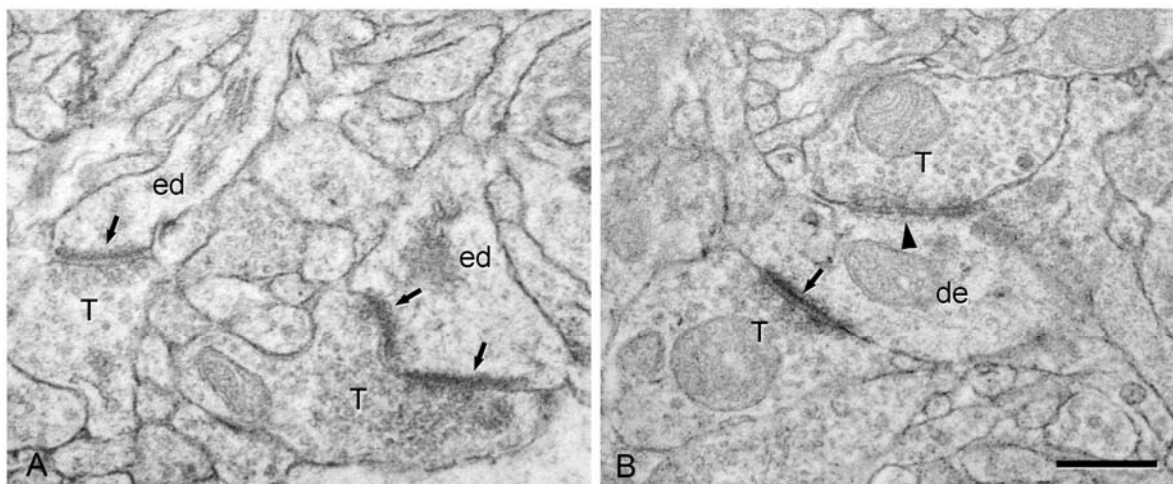


Fig. 7. Microfotografías electrónicas del neuropilo de la corteza cerebral humana para mostrar los dos tipos morfológicos de sinapsis. Las sinapsis asimétricas (flechas) tienen una densidad postsináptica gruesa mientras las sinapsis simétricas (punta de flecha) presentan una densidad postsináptica fina. Los terminales axónicos presinápticos (T) muestran numerosas vesículas sinápticas. de: dendrita; ed, espina dendrítica. Barra de escala: 0,4 μ m. Tomado de Alonso-Nanclares *et al.*, 2008.

En el hipocampo se destacan las conexiones axodendríticas de axones de la vía perforante y de colaterales de Shaffer con dendritas de células piramidales. Estas conexiones sinápticas son mayoritariamente de tipo asimétrico (excitador; Shepherd, 1974).

1.2.5. Vascularización del hipocampo

La distribución de oxígeno y sustancias nutritivas, y la eliminación de dióxido de carbono y otros productos metabólicos en el sistema nervioso central se lleva al cabo por el sistema vascular, que ocupa una parte importante del tejido cerebral. Al igual que otras estructuras cerebrales, el hipocampo se encuentra densamente vascularizado. Básicamente está constituido por arterias, arteriolas, capilares, venas y vénulas:

Arterias: de mayor diámetro, presentan tres capas una túnica íntima de células endoteliales; una túnica media, constituida por células musculares lisas; y túnica adventicia, constituida por fibroblastos y elementos fi-

brosos. El límite entre la túnica íntima y la túnica media está formado por la lámina basal, que contiene colágeno-IV (CLG-IV), y otros componentes de la matriz extracelular (Fig. 8; Ham, 1975; Fawcett, 1987).

Arteriolas: al igual que las arterias presentan tres capas. La túnica íntima está formada por células endoteliales, delimitada por una fina lámina basal que contiene colágeno-IV (Fig. 8; Ham, 1975). La túnica media está constituida por células de músculo liso, y la túnica adventicia está formada por fibroblastos y elementos fibrosos, y también contiene colágeno (Ham, 1975; Fawcett, 1987).

Capilares: están formados por una capa de células endoteliales, una lámina basal fina (30-40 nm de grosor) que contiene colágeno-IV y una pequeña red de fibras reticulares (Fig. 8; Fawcett, 1987). La lámina basal da lugar a un espacio perivascular en el que se sitúan los pericitos (Fawcett, 1987; Peters *et al.*, 1991; Larterra y Goldstein, 2000; Simard *et al.*, 2003).

Vénulas y venas: están formadas por túnica íntima, media y adventicia, y suelen tener válvulas (Fawcett, 1987).

El diferente grado de la vascularización del hipocampo hace posible la distinción de los distintos estratos de CA (Fig. 9). Los estratos *oriens*, *piramidale* y sobre todo *molecular*, tienen una alta densidad vascular, a pesar de su baja densidad celular (Duvernoy, 1998; Marinkovic *et al.*, 1992). La densidad de capilares en el estrato *radiatum* es menor, y se organizan en paralelo, al igual que las dendritas apicales de las neuronas piramidales. El estrato *lacunosum* es el menos vascularizado.

Si se consideran los diferentes campos, la vascularización más notable se presenta en CA2, seguida de CA3, mientras que CA1 es el menos vascularizado. En el giro dentado, la capa más vascularizada, a pesar de que tiene poca densidad celular, es la molecular, mientras que la capa granular, con gran densidad celular, tiene pocos capilares (Duvernoy, 1998). En el subículo, la densidad de capilares es algo más alta que en CA1 (Lokkegaard *et al.*, 2001).

1.2.5.1. Marcaje de la vascularización

Existen diversos métodos que permiten visualizar la red vascular presente en el tejido cortical (Fig. 9). En el presente apartado se describen brevemente algunos de los métodos más utilizados.

La microvascularización puede ser estudiada mediante observación directa en el microscopio óptico (Bell y Scarrow, 1984), en secciones semifinas (Lazzari y Franceschini, 2000) y en secciones ultrafinas, con ayuda del microscopio electrónico (Kasantikul *et*

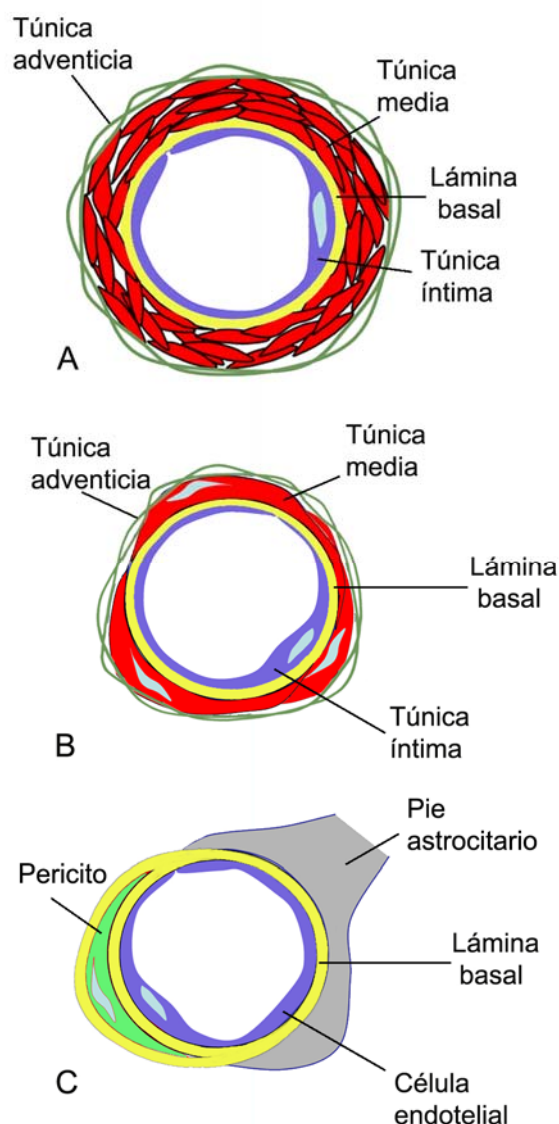


Fig. 8. Dibujos esquemáticos de los vasos sanguíneos, modificado de Drake y Iadecola, 2007. **A:** Arteria; **B:** Arteriola; **C:** Capilar.

al., 1983; Babb y Brown, 1986).

Igualmente, la red capilar puede ser visualizada mediante microscopía electrónica de barrido en tejido previamente tratado con resinas sintéticas (Fig. 9 C; Duvernoy, 1998).

Actualmente, existen técnicas de detección inmunohistoquímica, que permiten conocer selectivamente los distintos componentes de la red vascular. Se han descrito marcadores

propios de la lámina basal, como la laminina (Ballabh *et al.*, 2004; Caffo *et al.*, 2004; Hellsten *et al.*, 2005), el colágeno-IV (Caffo *et al.*, 2004; Cullen *et al.*, 2006) y la fibroconectina (Caffo *et al.*, 2004). También existen marcadores propios de células endoteliales, como la claudina-5 (Ballabh *et al.*, 2004), la isolectina B4 (Rigau *et al.*, 2007) o el receptor de eritropoyetina (EPO-R), que se localiza en la membrana de las células endoteliales (Eid *et al.*, 2004). Asimismo se han descrito marcadores del endotelio vascular relacionados con procesos de angiogénesis, como el Tie2 (del Zoppo y Mabuchi, 2003; Rigau *et al.*, 2007). Además, se pueden marcar las prolongaciones astrocitarias que forman parte de la barrera hematoencefálica, mediante la detección de canales, como la aquaporina-4 (Ballabh *et al.*, 2004). Otras sustancias presentes en el plasma, como el factor de coagulación Von Willebrand, puede marcarse selectivamente mediante una técnica inmunohistoquímica específica (Cullen *et al.*, 2006; Rigau *et al.*, 2007).

En cuanto a los métodos histoquímicos más utilizados para el estudio de la microvascularización, se encuentran la detección de la enzima nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato-diaforasa (NADPH-diaforasa), que es una enzima que está presente en el endotelio de vasos y capilares (Lin *et al.*, 2000), en el plexo axónico y en interneuronas de todas la capas de la corteza cerebral humana (DeFelipe, 1993b). Otro método histoquímico para estudiar la vascularización es la detección de la fosfatasa alcalina (en inglés *alkaline phosphatase*, que a partir de ahora denominaremos AP).

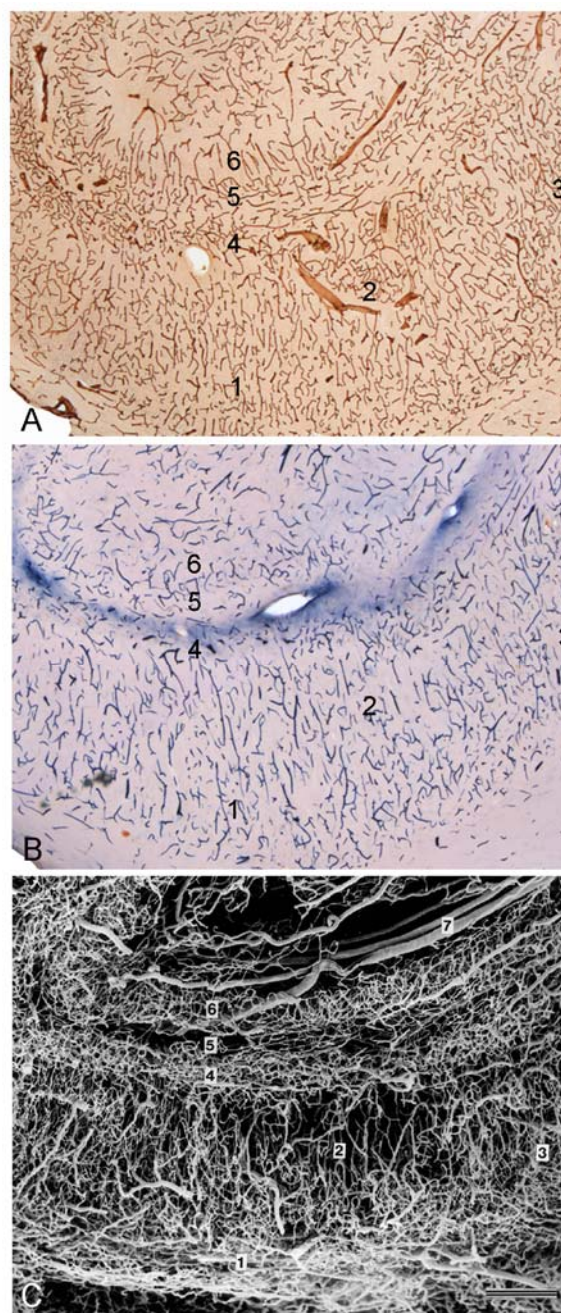


Fig. 9. Diversos métodos para visualizar el sistema vascular del hipocampo. **A:** Inmunohistoquímica para el colágeno-IV; **B:** Método histoquímico para la actividad de la enzima fosfatasa alcalina; **C:** Sección tratada con resinas sintéticas que permiten el estudio mediante microscopía electrónica de barrido, tomado de Duvernoy, 1998. 1: estrato *pyramidale*; 2: estratos *radiatum* y *lacunosum*; 3: CA1-subículo; 4: estrato *moleculare* de CA1; 5: surco hipocampal; 6: capa *moleculare* del giro dentado; 7: arterias intrahipocámpales. Barra de escala: 500 μ m.

La fosfatasa alcalina: la detección histoquímica de la AP fue utilizada por primera vez por Gomori (Gomori, 1939). Actualmente, existen diversos métodos de detección histoquímica de la AP que permiten el marcaje de la red capilar en la corteza cerebral y de algunas estructuras subcorticales (Bannister y Romanul, 1963; Friede, 1966; Manocha, 1970; Bell y Scarrow, 1984; Fonta y Imbert, 2002; Fonta *et al.*, 2004).

La AP pertenece a un grupo de isoenzimas que están codificados por diferentes genes y se encuentran en diversos tipos de células y tejidos. Algunas de las isoformas de la AP son específicas (como la intestinal y la de la placenta), pero existen otras no específicas que se localizan en el hígado, los riñones, los huesos y el cerebro. La AP presente en el cerebro se expresa en la barrera hematoencefálica (Sánchez del Pino *et al.*, 1995; Lawrenson *et al.*, 1999; Orte *et al.*, 1999; Aronica *et al.*, 2004) y está presente en los dos lados, tanto luminal como abluminal, de las células endoteliales cerebrales (Sánchez del Pino *et al.*, 1995). En la corteza visual de mono se ha descrito que la AP está presente tanto en las células endoteliales del cerebro como en el neuropilo (Fonta y Imbert, 2002).

En cuanto a su funcionalidad, se ha propuesto que la AP está involucrada en los mecanismos de maduración de la transmisión sináptica y la conductancia axonal durante el desarrollo postnatal del cerebro (Fonta *et al.*, 2005). Sin embargo, se desconoce su papel funcional (Bannister y Romanul, 1963; Friede, 1966; Manocha, 1970; Bell y Scarrow, 1984; Fonta y Imbert, 2002). Se ha demostrado, que ratones que no expresan la

AP (*AP-KO*), además de presentar defectos en la mineralización del esqueleto, desarrollan ataques epilépticos (Waymire *et al.*, 1995; Narisawa *et al.*, 1997; Narisawa *et al.*, 2001). Estos ataques epilépticos se han relacionado con la deficiencia de piridoxal -5'-fosfato (PLP) y con el metabolismo del GABA (Narisawa *et al.*, 2001). Se ha propuesto que en el ratón *AP-KO*, el PLP, que es uno de los sustratos de AP, no puede acceder a las células, donde su función es actuar como cofactor del GAD (la enzima de síntesis de GABA). Así, disminuiría la síntesis del GABA y podrían inducirse cambios en el balance entre excitación e inhibición (Fonta *et al.*, 2004). Además, se ha descrito epilepsia en casos de hipofosfatasa humana severa, que es la consecuencia de un defecto genético de la AP (Whyte *et al.*, 1988; Nunes *et al.*, 2002). En otros estudios realizados en rata, se ha mostrado que la actividad de la AP varía por la inducción de ataques epilépticos (Erakovic *et al.*, 2001).

En resumen, aunque la función de la AP en el sistema nervioso central se desconoce, su marcaje puede resultar de gran utilidad para estudiar el sistema microvascular cortical y sus posibles alteraciones.

1.3. EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL

La epilepsia es un síndrome crónico asociado a múltiples alteraciones cerebrales, que se caracteriza por una hiperactividad sincrónica e intermitente de grupos de células cerebrales, lo que provoca la aparición de crisis epilépticas. La epilepsia es una alteración muy frecuente en la especie humana, que afecta aproximadamente a una de cada 100 personas. En España, su prevalencia es de

320.000 personas (8 de cada 1000 habitantes) y su incidencia se ha estimado en 20.000 nuevos casos al año (Viteri e Iriarte, 1997; Argumosa y Herranz, 2005). Se calcula que aproximadamente 50 millones de personas en el mundo padecen epilepsia (según la Organización Mundial de la Salud).

Existen múltiples patologías corticales que se asocian con la epilepsia, aunque un número relativamente elevado de pacientes no presentan alteraciones patológicas aparentes. De hecho, sólo en un 30% de los pacientes epilépticos se puede identificar una alteración cerebral. En estos casos, se ha observado la presencia de diversas lesiones primarias que desencadenan la aparición de crisis epilépticas: traumatismos craneoencefálicos, infecciones, enfermedades degenerativas, malformaciones debidas a defectos del desarrollo, tumores cerebrales y alteraciones cerebro-vasculares (Meldrum, 1988; Annegers, 1993). No obstante, no existen lesiones intrínsecamente epileptogénicas, ya que pacientes con el mismo tipo de patología primaria y localizada en la misma estructura cerebral pueden desarrollar, o no, epilepsia (DeFelipe, 1999).

En un 20-30% de los casos, la epilepsia no se controla bien con los tratamientos farmacológicos convencionales (Langtry y Wastaff, 1997), y la frecuencia de las crisis hace que la calidad de vida de estos pacientes se vea muy afectada. En estos pacientes con epilepsia fármacorresistente, la resección quirúrgica del foco epiléptico se plantea como una opción para paliar o eliminar las crisis epilépticas. Sólo el 1-2% de los pacientes epilépticos son susceptibles de tratamiento

quirúrgico. Ciertas formas de epilepsia con un sustrato patofisiológico bien definido pueden tener excelente prognosis posquirúrgica (Engel, 2003). Por ello, es necesaria la evaluación exhaustiva del paciente mediante estudios de electrofisiología, neuropsicología y neuroimagen (Spencer y Spencer, 1994). Tras la intervención quirúrgica, se realiza un seguimiento que evalúa el resultado de la cirugía según la frecuencia y las características de las crisis postquirúrgicas, durante un período de dos años (Tabla 1, Engel, 1987). Los resultados quirúrgicos son muy variables en función de las características de los pacientes y el éxito en la identificación del foco epiléptico.

Las manifestaciones clínicas de la epilepsia dan lugar a multitud de síndromes epilépticos. Estos síndromes se definen teniendo en cuenta diferentes factores, tales como el tipo de crisis, la edad de inicio de las crisis, la historia de las crisis y los síntomas neurológicos asociados. Uno de los síndromes epilépticos más frecuentes es la epilepsia del lóbulo temporal (ELT), que se caracteriza por presentar crisis parciales que se originan en este lóbulo. Se da la circunstancia que la ELT es la forma más común de la epilepsia fármacorresistente (Honavar y Meldrum, 1997).

El hallazgo patológico más frecuente en pacientes con ELT es la esclerosis del hipocampo o esclerosis temporal mesial (ETM), ya que está presente en un 50-70% de las biopsias o autopsias de los pacientes afectados por este síndrome (Babb y Brown, 1986; Engel, 1993; Honavar y Meldrum, 1997; Blümcke *et al.*, 2002). En aproximadamente un 25% de los pacientes con escle-

rosis del hipocampo pueden aparecer otras lesiones en la neocorteza, es decir, alteraciones extrahipocampales como tumores, disgenesias o malformaciones vasculares (Babb y Brown, 1987; Engel, 1993; Raymond *et al.*, 1994; Honavar y Meldrum, 1997; Blümcke *et al.*, 1999; Blümcke *et al.*, 2002; Thom *et al.*, 2002).

La presencia de ETM en los pacientes con ELT se ha asociado con la existencia de un factor desencadenante o patología neurológica severa en la infancia, especialmente antes de los 4 años. El grupo de investigación de Mathern (Mathern *et al.*, 2002) ha descrito que el 87 % de los pacientes con ELT y esclerosis temporal mesial (ETM) presentan un factor desencadenante inicial, de los cuales un 80% ocurre antes de los primeros 4 años de vida. Estos factores desencadenantes incluyen infecciones, traumatismo craneoencefálico, hipoxia, crisis febriles

complejas, crisis epilépticas y *status* epiléptico (Meyer *et al.*, 1954; Cavanagh y Meyer, 1956; Falconer y Taylor, 1968; Sagar y Oxbury, 1987; French *et al.*, 1993; Spencer, 1998; Mathern *et al.*, 2002). Entre estos factores desencadenantes el 75% de los pacientes con ETM presentan historial de crisis febriles complejas antes de los 3 años de edad (Sagar y Oxbury, 1987). Las crisis febriles son crisis epilépticas que se dan en la infancia, mayoritariamente entre los 3 meses y los 5 años de edad, asociadas a fiebre pero sin evidencia de infección intracraneal o causa definida (Consensus, 1981). Tienen un componente genético, ya que son más frecuentes en familias con historial de crisis febriles (Fukuyama *et al.*, 1979; Nelson y Ellenberg, 1976; Nelson y Ellenberg, 1990). Si estas crisis son focales, recurrentes y prolongadas, el riesgo de sufrir epilepsia posterior asciende al 50% (Annegers, 1993).

Tabla 1. Escala de evaluación del resultado quirúrgico, modificado de Engel, 1987.

Clase I: Libre de crisis

A: Completamente libre de crisis desde la operación

B: Crisis focales simples no incapacitantes

C: Alguna crisis no incapacitante después de la operación, pero libre de crisis incapacitantes durante al menos dos años

D: Crisis generalizadas debidas al abandono de los fármacos antiepilépticos

Clase II: Crisis poco frecuentes (prácticamente libre de crisis)

A: Inicialmente libre de crisis pero con alguna crisis desde la intervención

B: Muy pocas crisis desde la intervención

Clase III: Mejoría considerable

A: Reducción del numero de crisis

B: Intervalos prolongados libres de crisis (pero menos de dos años de duración)

Clase IV: Ligera mejoría

1.4. ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO

1.4.1. Histopatología de la esclerosis del hipocampo y epileptogenicidad

Desde que Meynert en 1867 (Meynert, 1867) describiera alteraciones en la estructura del hipocampo, que fueron consideradas como patologías directamente relacionadas con la epilepsia, la relación de este síndrome con lesiones estructurales ha sido estudiada por numerosos investigadores.

La esclerosis del hipocampo, en general, se caracteriza por presentar gliosis y pérdida neuronal (Fig. 10). Dicha pérdida es más pronunciada en CA1, seguida por CA3, CA2 y la capa granular del giro dentado (Meldrum y Bruton, 1992; Babb y Pretorius, 1993; Honavar y Meldrum, 1997; Houser, 1999; Mouritzen-Dam, 1980, 1982; Babb *et al.*, 1984a; Babb *et al.*, 1984b; Houser, 1992). Es frecuente la dispersión de la capa granular del giro dentado y la aparición de neuronas ectópicas en la capa molecular (Mouritzen-Dam, 1982; Babb *et al.*, 1984a; Babb *et al.*, 1984b; Houser, 1990; Houser *et al.*, 1992; Arellano *et al.*, 2004). Sin embargo, existe una gran variabilidad con respecto al grado de gliosis y pérdida neuronal (Arellano *et al.*, 2004).

Asimismo, puede haber otras estructuras mesiales alteradas, como la amígdala o la corteza entorrinal (Du *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1994; Yilmazer-Hanke *et al.*, 2000), por lo que se denomina también esclerosis temporal mesial (Falconer *et al.*, 1964).

En la esclerosis del hipocampo se ha observado, además de pérdida neuronal y gliosis, otras alteraciones histopatológicas que podrían estar relacionadas con la epileptogenicidad:

Alteraciones vasculares: principalmente en los capilares;


Modificación de los circuitos sinápticos: que incluye el crecimiento y la reorganización de axones, así como una sinaptogénesis reactiva;

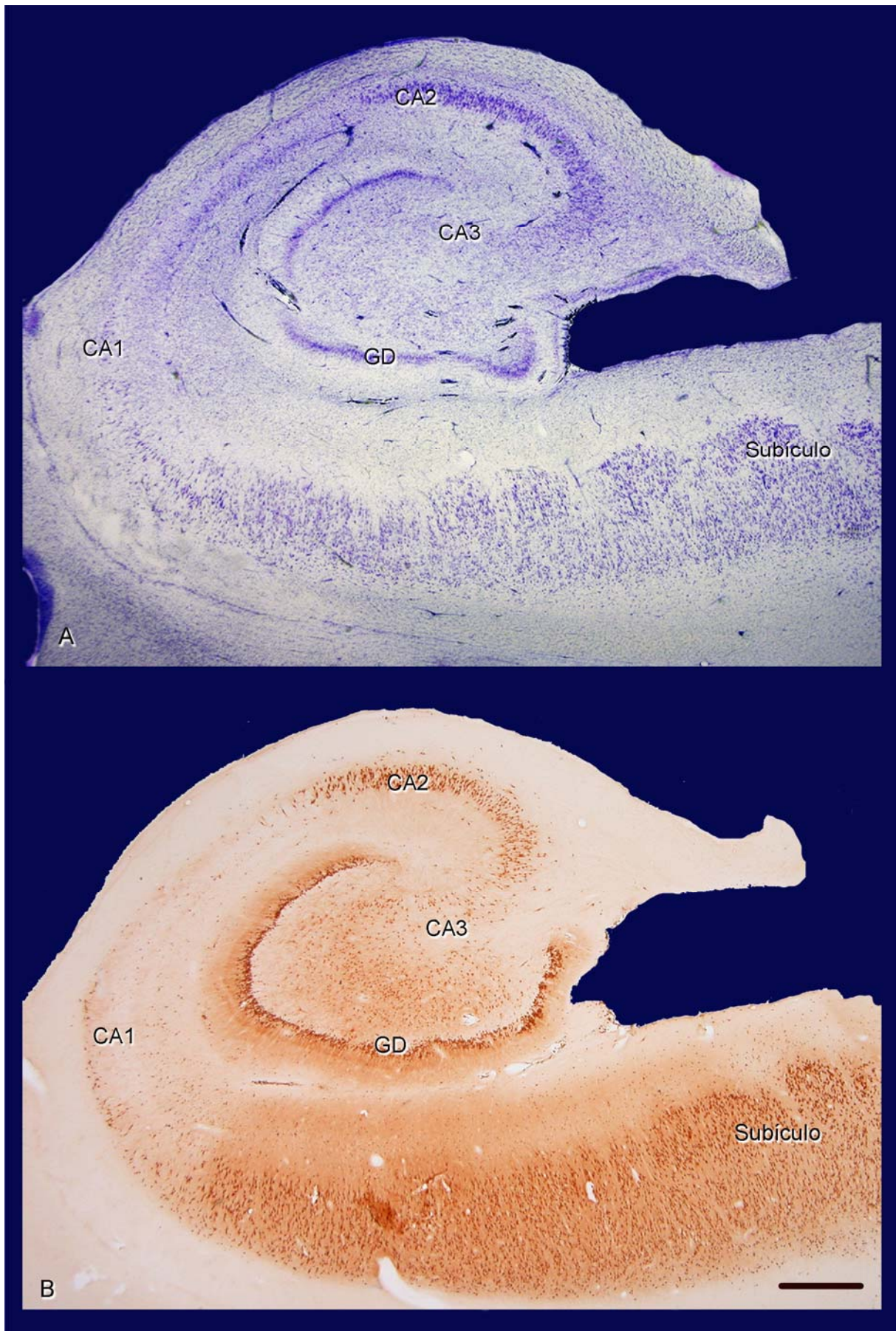
Alteraciones de los sistemas de neurotransmisores: que pueden afectar tanto a la excitación como a la inhibición.

1.4.1.1. Alteraciones vasculares

Tanto en el hipocampo esclerótico de pacientes con ELT, como en modelos animales de epilepsia se observan alteraciones morfológicas y funcionales de la vascularización. Se ha descrito la aparición de discontinuidades en la barrera hematoencefálica de la corteza en modelos animales de epilepsia (Tomkins *et al.*, 2007), así como, la subsecuente infiltración perivascular de linfocitos en el parénquima cerebral (Cook y Persinger, 1999). Igualmente en el hipocampo esclerótico de pacientes con ELT, se han descrito cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Van Vliet *et al.*, 2007; Rigau *et al.*, 2007), y proliferación microvascular o angiogénesis (Rigau *et al.*, 2007).

Estudios ultraestructurales de la red capilar de biopsias de tejido cerebral procedente de

Fig. 10. Microfotografías panorámicas de la formación del hipocampo humano de un paciente epiléptico con esclerosis del hipocampo, teñida con el método de Nissl (A), y con marcaje inmunohistoquímico para NeuN (B) en las que se indican los diferentes campos. En CA1 se observa una clara pérdida neuronal y gliosis. CA1-3: campos ammónicos; GD: giro dentado. Barra de escala 1000 μ m. 



pacientes con epilepsia focal, muestran la existencia de numerosas alteraciones estructurales, como discontinuidad de la lámina basal, vacuolas en células endoteliales, abundantes prolongaciones astrocitarias en algunos capilares, un incremento significativo del grosor de la lámina basal y disminución del número de mitocondrias en las células endoteliales (Kasantikul *et al.*, 1983; Babb y Brown, 1986; Hildebrandt *et al.*, 2008). La presencia de estas alteraciones se ha relacionado con la deficiencia de la funcionalidad de la barrera hematoencefálica, que podría contribuir a la pérdida y degeneración neuronal, así como a una alteración de la excitabilidad neuronal (Kasantikul *et al.*, 1983; Babb y Brown, 1986). Sin embargo, no está clara su relación con la actividad epileptiforme.

Uno de los objetivos del presente trabajo es estudiar las alteraciones en la vascularización que tienen lugar en el hipocampo esclerótico de pacientes epilépticos.

1.4.1.2 Modificación de los circuitos sinápticos

Tanto en tejido procedente de hipocampos escleróticos de pacientes epilépticos, como en modelos animales de epilepsia, se han descrito fenómenos de crecimiento y reorganización axónica, tanto excitadores como inhibidores (Avoli, 1983; Avoli *et al.*, 2002; Prince *et al.*, 1997; DeFelipe, 1999; Bausch, 2005; Loup *et al.*, 2006).

En CA1, se ha observado una proliferación aberrante de las colaterales axónicas de las neuronas piramidales en ratas tratadas con pilocarpina (Fig.11, Esclapez *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 2000) o kainato (Pérez *et*

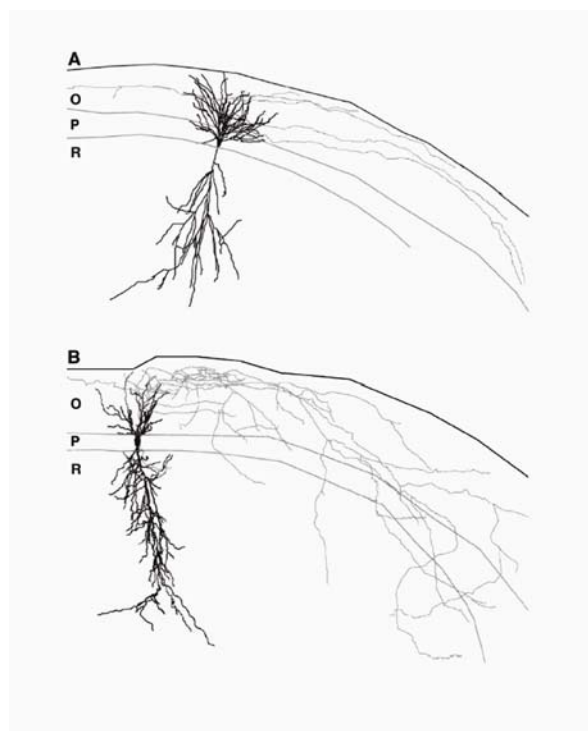


Fig. 11. Esquema para ilustrar la modificación de circuitos sinápticos de CA1 en un modelo animal de epilepsia, modificado de Esclapez *et al.*, 1999. **A:** Célula piramidal de CA1 de animal control; **B:** Célula piramidal de CA1 en un animal tratado con pilocarpina. Nótese la proliferación de colaterales axónicas. O: estrato *oriens*; P: estrato *piramidale*; R: estrato *radiatum*.

al., 1996; Esclapez *et al.*, 1999), así como en pacientes con ELT (Lehmann *et al.*, 2000). Se ha propuesto que el crecimiento de colaterales axónicas locales de células piramidales de CA1, hacia los estratos *oriens*, *piramidale* y *radiatum* (lo que no se observa en los controles), incrementaría la excitación recurrente mediante la formación de nuevas sinapsis, posiblemente "autapsis", con dendritas de las células piramidales (Esclapez *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 2000; Morimoto *et al.*, 2004). Además, estas nuevas conexiones parecen ser funcionales y pueden participar en la actividad paroxística (Esclapez *et al.*, 1999).

En el hipocampo humano también han sido descritos fenómenos de reorganización de axones GABAérgicos, que incluyen una pérdida de innervación GABAérgica en el neuropilo, así como la aparición de hiperinnervación aberrante perisomática en algunas de las neuronas supervivientes en áreas de CA1 (Arellano *et al.*, 2004).

Existen estudios que demuestran la existencia de crecimiento axónico y reorganización sináptica en el giro dentado, tanto de modelos animales de epilepsia, como de hipocampos procedentes de pacientes con esclerosis (Nadler *et al.*, 1981; Mello *et al.*, 1993; Sutula *et al.*, 1989; Cavazos *et al.*, 1991; Cavazos *et al.*, 1994). Los axones de las células granulares (fibras musgosas) proliferan, y emiten colaterales aberrantes que terminan en la capa molecular interna del giro dentado, formando sinapsis excitadoras con las dendritas de las células granulares tanto en hipocampos escleróticos de pacientes epilépticos, como en los de modelos animales de epilepsia (de Lanerolle *et al.*, 1989; Sutula *et al.*, 1989; Sutula *et al.*, 1998; Houser *et al.*, 1990; Babb *et al.*, 1991; Mathern *et al.*, 1995a; Zhang y Houser, 1999; Avoli *et al.*, 2002; Morimoto *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005). Este tipo de proliferación no existe en el tejido procedente de autopsias control (Dietrich *et al.*, 1999). La reorganización de las fibras musgosas se ha considerado como un proceso de sinaptogénesis reactiva (Cotman y Nadler, 1978), relacionado con la pérdida de sinapsis excitadoras en la parte interna de la capa molecular del giro dentado, como consecuencia de la muerte de las células musgosas (Babb *et al.*, 1991; Cavazos y Sutula, 1990; Houser *et al.*, 1990; Ma-

sukawa *et al.*, 1997).

A pesar de los citados estudios sobre la reorganización sináptica en el hipocampo, hasta la fecha, no existen estudios cuantitativos sobre las posibles alteraciones en la densidad sináptica. Por ello uno de los principales objetivos del presente estudio es analizar las posibles alteraciones en la densidad sináptica en el hipocampo de pacientes con ELT.

1.4.1.3. Alteraciones en los sistemas de neurotransmisores

Existen numerosos estudios que apoyan la teoría de que la epilepsia puede ser debida a un desequilibrio entre los sistemas excitadores e inhibidores, ya que se han descrito cambios en la expresión de varias moléculas, tanto relacionadas con los circuitos excitadores como con los inhibidores (de Lanerolle *et al.*, 1989; Sutula *et al.*, 1989; Babb *et al.*, 1991; Babb *et al.*, 2000; Sloviter *et al.*, 1991; Mathern *et al.*, 1995a; Muñoz *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2007; Wittner *et al.*, 2002; Arellano *et al.*, 2004).

Hay diversos tipos de epilepsia que se han relacionado con una alteración de la transmisión sináptica glutamatérgica (revisado en Chapman *et al.*, 1996). En hipocampos escleróticos procedentes de pacientes con ELT, se han descrito alteraciones en la expresión de subunidades de receptores ionotrópicos de tipo AMPA (Lynd-Balta *et al.*, 1996; Ying *et al.*, 1998). En cuanto a los receptores metabotrópicos, se han observado alteraciones funcionales que pueden favorecer la actividad epileptiforme (Blümcke *et al.*, 2000; revisado en Alexander y Godwin, 2006).

Con respecto al sistema GABAérgico, se

han descrito alteraciones en la distribución y composición de subunidades del receptor GABA_A relacionadas con la hiperexcitabilidad del hipocampo tanto en modelos animales de epilepsia (Schwarzer *et al.*, 1997; Brooks-Kayal *et al.*, 1998; Nusser *et al.*, 1998; Coulter, 2000) como en pacientes con ELT (Olsen *et al.*, 1992; Koepp *et al.*, 1996; Fritschy *et al.*, 1999; Avoli *et al.*, 2002; Loup *et al.*, 2006). Igualmente, en el hipocampo esclerótico de pacientes epilépticos, se ha descrito una disminución en el marcaje de los receptores GABA_B en las células granulares del giro dentado, lo que podría generar una pérdida de la inhibición lenta en estas neuronas (Muñoz *et al.*, 2002).

Por otra parte, Cohen y sus colaboradores (Cohen *et al.*, 2003) propusieron un cambio del efecto del GABA en el hipocampo esclerótico, de hiperpolarizante a despolarizante, que podría deberse a una alteración en el equilibrio de la actividad de los cotransportadores NKCCs y KCCs. En condiciones normales, los cotransportadores Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCCs) acumulan Cl⁻ en el interior de las células, y el co-transportador K⁺-Cl⁻ (KCCs) expulsa Cl⁻ (Alvarez-Leefmans *et al.*, 2001; Delpire y Mount, 2002; Payne *et al.*, 2003). El estudio de la expresión de NKCC y KCC2 en el hipocampo esclerótico de pacientes epilépticos (Muñoz *et al.*, 2007) mediante técnicas inmunocitoquímicas, ha mostrado que en las áreas escleróticas y en las regiones adyacentes, aproximadamente un 20% de las neuronas NKCC-positivas no expresaban KCC2. En estas mismas áreas se observó que en secciones doblemente marcadas para parvalbúmina (PV) y NKCC, o PV y KCC2, un 25% de los cestos hipertró-

ficos PV-positivos inervaban células piramidales que no expresaban KCC2, mientras que la mayoría de las células piramidales hiperinervadas expresaban NKCC (Fig 12). En resumen, la hiperinervación GABAérgica aberrante de ciertas células en el hipocampo esclerótico que expresan NKCC y de neuronas que no expresan KCC2, y la existencia de neuronas que expresan NKCC pero no KCC2, podría representar el sustrato anatómico/molecular que explicara las respuestas anómalas despolarizantes inducidas por el GABA encontradas por Cohen en ciertas células piramidales del hipocampo esclerótico (Cohen *et al.*, 2002).

Por lo tanto, en el hipocampo epiléptico puede haber modificaciones en varios sistemas de neurotransmisores simultáneamente que pueden influir en su epileptogenicidad.

1.4.2. Relación entre esclerosis del hipocampo y crisis epilépticas

La relación entre la esclerosis y la manifestación de crisis epilépticas ha sido objeto de numerosos estudios, pero aún existe un intenso debate sobre si la esclerosis mesial es causa o efecto de la epilepsia, ya que se han encontrado evidencias que apoyan ambas hipótesis (Babb y Brown, 1987; Gloor, 1991; Meldrum y Bruton, 1992; Mathern *et al.*, 2002).

Existen estudios que apoyan la aparición de la esclerosis del hipocampo como consecuencia de la epilepsia. Por ejemplo, en estudios realizados en monos a los que se les indujeron crisis epilépticas mediante la aplicación de gel de alúmina en la neocorteza (Fig. 13; Ribak *et al.*, 1998), se encontraron cambios morfológicos, que incluían la pér-

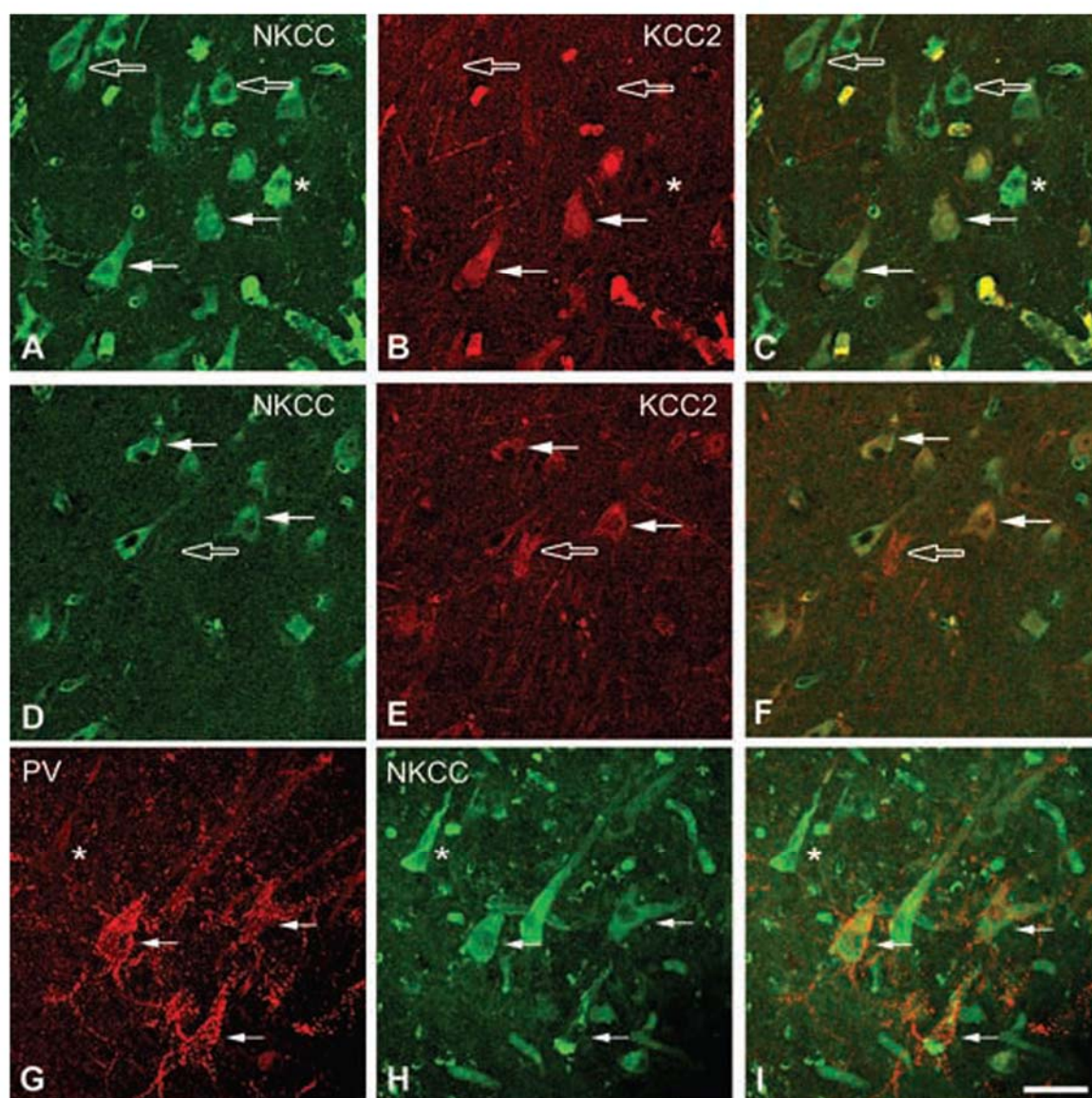


Fig. 12. Imágenes obtenidas con el microscopio confocal para ilustrar el doble marcaje de NKCC y KCC2 en la formación del hipocampo. **A–F:** Imágenes obtenidas en la región de transición subículo /CA1 (A-C) y CA3 (D-F). Las neuronas NKCC-positivas se marcan en verde (A y D), y en rojo las KCC2-ir (B y E). C y F se obtuvieron tras combinar A y B, y D y E respectivamente. Las flechas opacas indican colocolización NKCC y KCC2, las flechas transparentes indican aquellas células que colocolizan con marcaje difuso, y los asteriscos señalan las células positivas para NKCC que no expresan KCC2. También se ilustran algunas células KCC2-ir que no colocolizan para NKCC (flechas transparentes en D-F). **G–I:** Formaciones en cesto positivas para PV (en rojo), que rodean células piramidales marcadas para NKCC (verde) en la región subículo/CA1. **I** se obtuvo tras combinar G y H. En esta serie, las flechas señalan las células NKCC-ir inervadas por terminales PV-ir. Algunas células NKCC-ir carecen de esta inervación (asteriscos). A-C, proceden de una pila de 10 secciones ópticas obtenidas cada 1,74 μm según el eje z (total: 16 μm). D-F, se obtuvieron de una sola sección óptica de 1 μm de grosor. G-I, proceden de una pila de 10 secciones ópticas obtenidas cada 1,53 μm según el eje z (total: 13,8 μm). Barra de escala: 30 μm . Tomada de Muñoz et al., 2007.

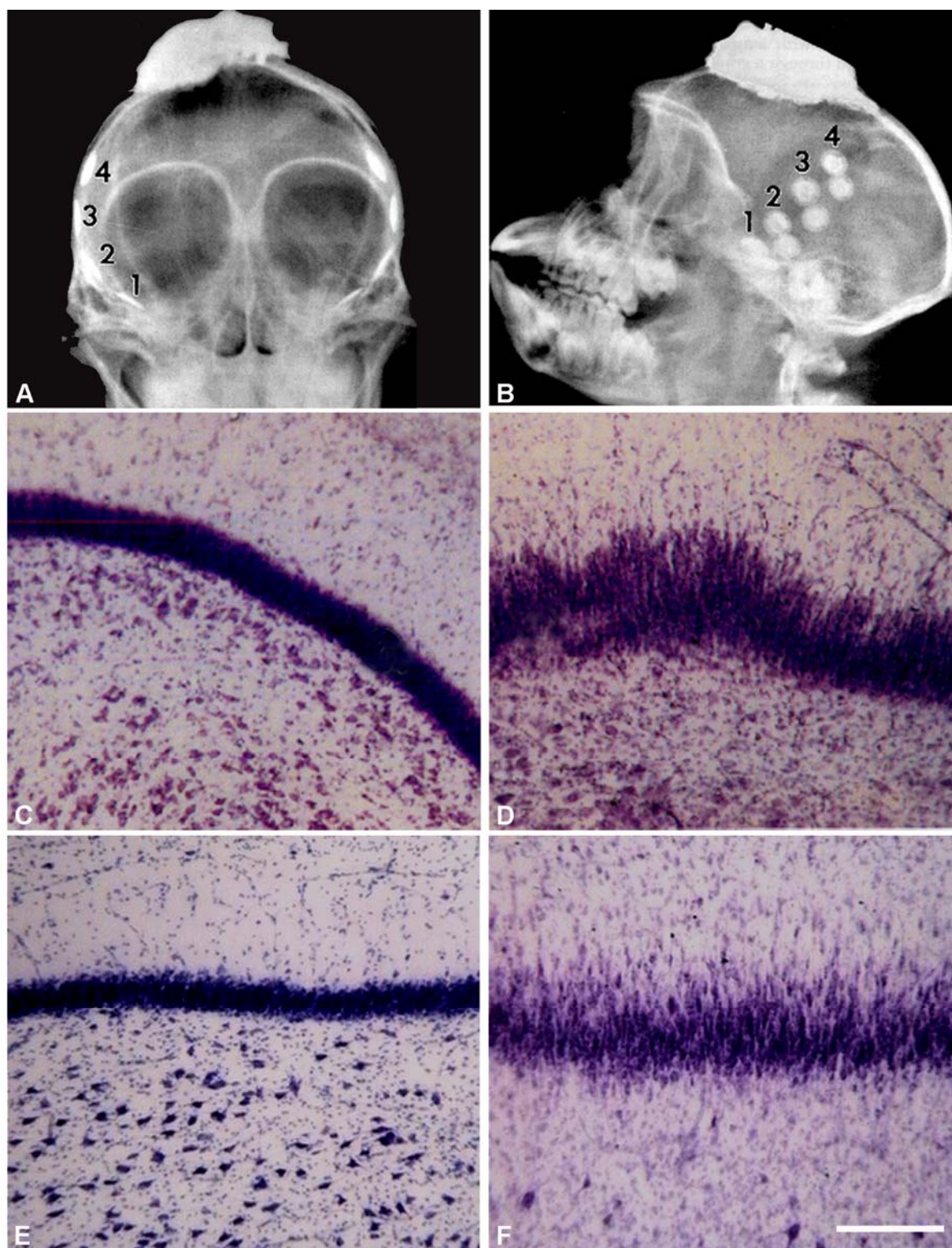


Fig. 13. Estudio de un modelo de ELT mediante la aplicación de gel de alúmina en mono. **A, B:** Imágenes de rayos X del plano antero-posterior (**A**) y lateral (**B**) de la cabeza de un mono tratado, que ilustra la posición de los electrodos implantados (1-4), para registrar la actividad epileptiforme debida a la aplicación del gel. **C, E:** Secciones teñidas con el método de Nissl que ilustran el GD normal de un mono sin tratar, y de un paciente control. **D:** Sección teñida con el método de Nissl de un animal tratado que muestra el GD con cambios morfológicos (dispersión de las células granulares), similares a los que se observan en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal (**F**). Barra de escala: 400 μ m en C-F. A-D: modificado de Ribak et al., 1998.

dida de neuronas y terminales axónicos GABAérgicos, con un patrón muy similar al encontrado en pacientes con ELT (Fig. 13). Posteriormente, el equipo de Dinocourt (Dinocourt *et al.*, 2003) analizó la región de CA1 del hipocampo de ratas que presentaban ataques límbicos crónicos (inducidos tras la inyección de pilocarpina) y observaron que entre las interneuronas GABAérgicas vulnerables se encontraban las células que expresaban PV. Ciertamente, la actividad epiléptica crónica en los modelos experimentales aparece después de causar una pérdida neuronal y gliosis, pero la manifestación de los ataques no es inmediata tras la aplicación del factor desencadenante que induce el daño neuronal y gliosis, sino que transcurre un tiempo más o menos largo dependiendo del modelo.

También se ha propuesto que la presencia de un factor desencadenante genera alteraciones en estructuras temporales mesiales, que son las responsables de la generación de crisis, que a su vez contribuyen a incrementar el daño y la hiperexcitabilidad neuronal (Mathern *et al.*, 2002).

No obstante, se ha cuestionado la capacidad del hipocampo esclerótico para generar las crisis epilépticas, dado que presenta una importante pérdida de las neuronas excitadoras (Mathern *et al.*, 1995a) y gliosis, lo que podría contribuir a la interrupción de los circuitos hipocampales, y a dificultar la propagación de la actividad epileptiforme.

Sin embargo, la resección quirúrgica del hipocampo en pacientes epilépticos con esclerosis suele ser favorable, en cuanto a la reducción en el número y la frecuencia de las crisis, por lo que se ha propuesto que el hi-

pocampo es clave en el desarrollo de la hiperexcitabilidad, y por lo tanto de las crisis epilépticas (Falconer *et al.*, 1964; Falconer y Taylor, 1968; Babb y Brown, 1987; Wieser *et al.*, 1993; Wieser *et al.*, 2003; Spencer y Spencer, 1994; York *et al.*, 2003).

1.5. ALTERACIONES EN LA CORTEZA LATERAL DE PACIENTES CON ELT

Se ha propuesto que la presencia de patologías extrahipocampales, en la corteza temporal lateral de pacientes con ETM, está relacionada con la epileptogenicidad, ya que se obtienen mejores resultados en la cirugía que incluye la resección tanto del hipocampo esclerótico como de una parte de la corteza temporal adyacente (Li *et al.*, 1999). La ablación incompleta del tejido lesionado tanto del hipocampo, como de la corteza, puede ser una de las razones por las que el resultado quirúrgico es poco favorable (Fig. 14). Esto sugiere que, tanto la lesión de la corteza, como del hipocampo esclerótico, son potencialmente epileptogénicos y podrían provocar crisis de forma independiente (Levesque *et al.*, 1991; Nakasato *et al.*, 1992; Raymond *et al.*, 1994; Prayson *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1999).

Se ha observado que aproximadamente un 5-30% de los pacientes con ELT muestran simultáneamente esclerosis temporal mesial y otras lesiones extrahipocampales, y la coexistencia de ambas lesiones se ha denominado patología dual (Fig. 15; Levesque *et al.*, 1991; Raymond *et al.*, 1994; Prayson *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 1998; Blümcke *et al.*, 1999; Cendes *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Nishio *et al.*, 2000). En estos pacientes con patología dual, la más frecuente es la pre-

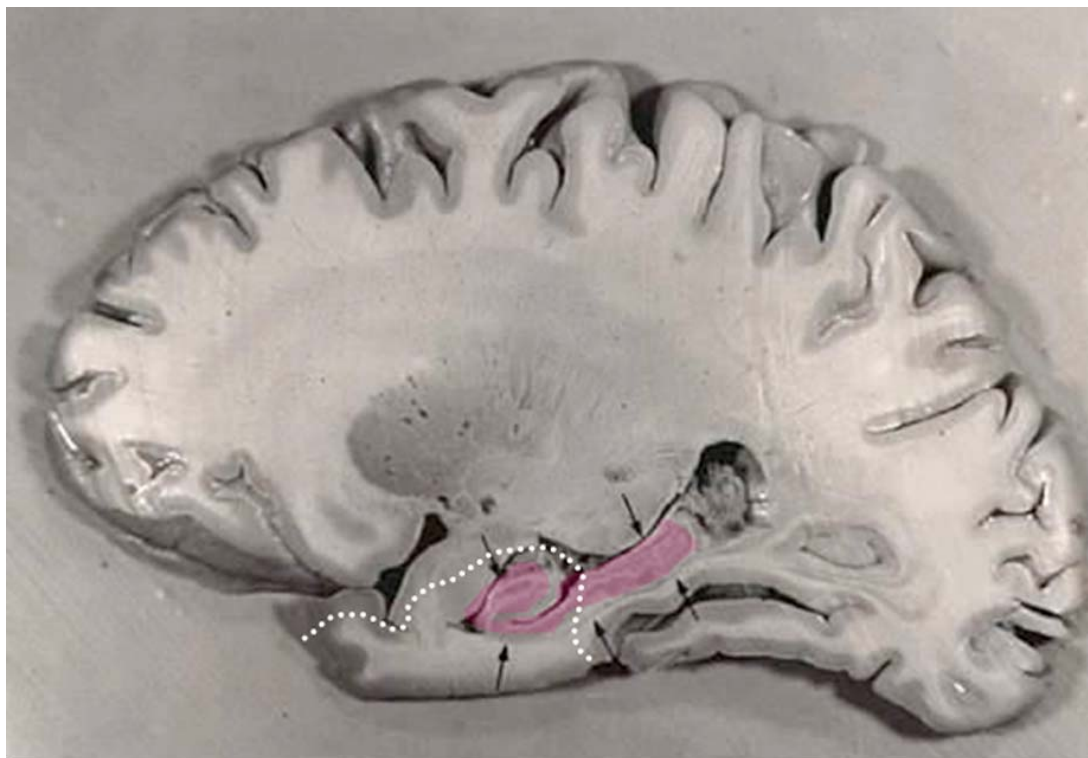


Fig. 14. Vista sagital de un cerebro humano en la que se ha marcado la extensión antero-posterior del hipocampo (en color rosa, flechas). La línea de resección del tratamiento quirúrgico de la epilepsia (línea de puntos) incluye la corteza temporal y el hipocampo anterior. Sin embargo, la parte posterior del hipocampo queda fuera del límite de resección y puede contener alteraciones patológicas.

sencia de malformaciones del lóbulo temporal, que suponen un 87% de las alteraciones encontradas (Ho *et al.*, 1998). Estas malformaciones del lóbulo temporal incluyen displasias y tumores, así como la presencia de lesiones vasculares (Levesque *et al.*, 1991; Meldrum y Bruton, 1992; Raymond *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1998; Blümcke *et al.*, 1999; Cendes *et al.*, 1999; Nishio *et al.*, 2000; Palmmini y Luders, 2002; Salanova *et al.*, 2004; Hildebrandt *et al.*, 2008).

Las alteraciones microscópicas de la corteza temporal no se detectan mediante técnicas de imagen convencionales, y requieren de un análisis histopatológico específico y detallado una vez resecado el tejido (DeFelipe *et al.*, 1993; Marco *et al.*, 1996; Nishio *et al.*, 2000; revisado en Palmmini *et al.*, 2004).

Puesto que generalmente este tipo de análisis no se realiza, es probable que las alteraciones microscópicas de la corteza temporal lateral sean más comunes de lo que se cree en la actualidad. Se ha propuesto que la presencia de dichas alteraciones podría contribuir a la generación de crisis (revisado en Rickert, 2006), aunque existen autores que afirman que la presencia de estas lesiones no tiene relación clara con la epileptogenicidad del tejido (Kalnins *et al.*, 2004).

Por lo tanto, uno de los objetivos del presente trabajo es re-examinar la relación de los cambios histopatológicos “primarios” como la esclerosis del hipocampo y la presencia de alteraciones microscópicas en la corteza cerebral.

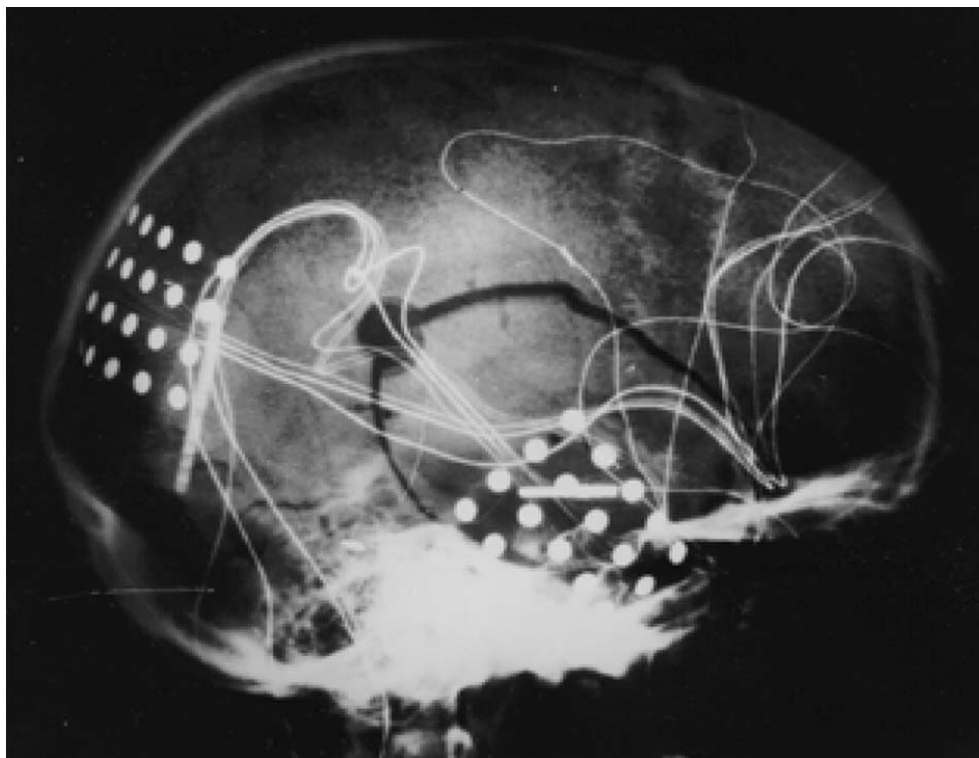


Fig. 15. Imagen de rayos X en la que se observa el registro simultáneo con dos mantas de electrodos subdurales localizadas en diferentes puntos de la corteza para obtener registros electrocorticográficos que permiten localizar las regiones epileptógenas. En este caso, se registró actividad epileptogénica en ambas regiones, lo que corresponde a una patología dual.

OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es profundizar en el conocimiento de las alteraciones histopatológicas presentes tanto en el hipocampo como en la corteza temporal lateral de pacientes con ELT. Para ello, el trabajo se ha dividido en tres partes:

ESTUDIO DE LA VASCULARIZACIÓN DEL HIPOCAMPO:

1. Analizar detalladamente la microvascularización de la formación del hipocampo mediante microscopía óptica en secciones marcadas por las tinciones histoquímica para fosfatasa alcalina (AP) e inmunohistoquímica para el colágeno-IV, y el estudio en secciones semifinas. Este análisis se realizará en hipocampos procedentes de autopsias y de pacientes con ELT, con y sin esclerosis del hipocampo.
2. Estudiar las características ultraestructurales de las posibles alteraciones de la microvascularización del hipocampo esclerótico mediante métodos de correlación de microscopía óptica y electrónica.

ESTUDIO DE LOS CIRCUITOS SINÁPTICOS EN EL HIPOCAMPO:

3. Determinar las alteraciones de la ultraestructura de la formación del hipocampo procedente de pacientes con ELT, con y sin esclerosis del hipocampo.
4. Estudiar las características y la densidad sináptica en diferentes regiones del hipocampo mediante técnicas de microscopía electrónica.
5. Establecer la posible relación de las alteraciones sinápticas con la epileptogenicidad del tejido.

ESTUDIO MICROANATÓMICO DE LA CORTEZA TEMPORAL DE PACIENTES CON ELT QUE PRESENTAN ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO:

6. Determinar la presencia de alteraciones microanatómicas en la corteza lateral aparentemente normal de pacientes con ELT.
7. Estudiar la posible relación de estas lesiones corticales con la esclerosis de hipocampo.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL HUMANO

El tejido cerebral humano se obtuvo de autopsias (proporcionadas por el Dr. R. Alcaraz, Servicio de Patología Forense, Instituto Vasco de Medicina Legal, Bilbao) y de biopsias procedentes de la cirugía del lóbulo temporal de pacientes con ELT (realizadas por el equipo del Dr. R. García de Sola del Dpto. de Neurocirugía, Hospital de la Princesa, Madrid).

El tejido obtenido de las autopsias (2-3 horas post-mortem) procedía de 5 individuos sin alteraciones neurológicas (edad 23, 40, 49, 63 y 69 años), fallecidos por accidentes de circulación. En el caso de las biopsias, el hipocampo y la corteza temporal se obtuvieron del tratamiento quirúrgico de 37 pacientes (Tabla 2). En pacientes con ELT intratable (o fármacorresistente) el tratamiento quirúrgico es una aproximación terapéutica que trata de eliminar el foco epi-

léptico, localizado previamente mediante estudios de electrofisiología invasiva y no invasiva, video-EEG, neuroimagen y neuropsicología (Spencer y Spencer, 1994; Sola *et al.*, 2005).

Todas las intervenciones fueron llevadas a cabo por el equipo del Dr. Rafael García de Sola, contando con el consentimiento de los pacientes y la aprobación del comité ético del hospital (Hospital de la Princesa, Madrid). El tratamiento quirúrgico aplicado para la eliminación del foco epiléptico fue la lobectomía temporal basada en electrocorticografía (Fig. 16; Penfield y Jasper, 1954). Esta intervención se realiza en dos etapas. En la *primera*, se reseca una extensión variable de la corteza temporal anterior de acuerdo a la actividad interictal observada en el registro electrocorticográfico intraoperatorio. Durante la cirugía, este registro permite identificar las zonas epileptogénicas mediante el registro subdural con una manta

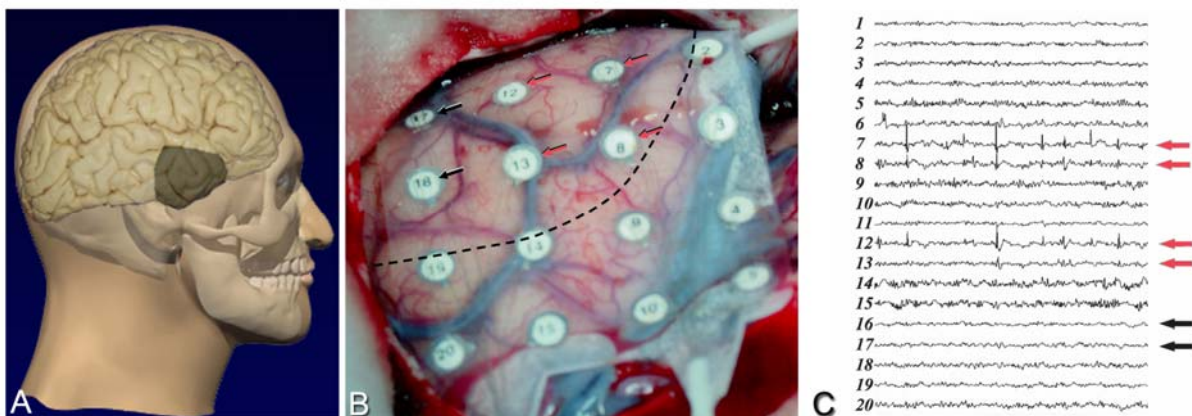


Fig. 16. Cirugía de la epilepsia. **A:** Esquema para ilustrar la localización del área cerebral donde se realiza el tratamiento quirúrgico de la ELT (sombreado). **B:** Fotografía de la manta de electrodos localizada directamente sobre la superficie cortical del lóbulo temporal durante la operación. Las flechas indican los electrodos de registro situados en la zona de resección (ver C), y la línea discontinua indica el límite de la resección quirúrgica. **C:** Registro electrocorticográfico obtenido mediante la manta de electrodos mostrada en B. Las flechas rojas indican los electrodos con una mayor actividad epileptiforme (7,8,12,13). Las flechas opacas señalan los electrodos 16 y 17, que presentaron una actividad normal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2. Resumen de los datos clínicos de los pacientes epilépticos. **AP:** Marcaje histoquímico para la fosta-ta-sa alcalina; **CLG-IV:** Marcaje inmunohistoquímico para el colágeno de tipo IV; **V_v:** Estimación de la fracción de volumen de los vasos sanguíneos; **ME:** Estudio de los circuitos sinápticos del hipocampo, **CxT:** Estudio de la corteza temporal lateral. m: Mujer, v: Varón. PS: Parcial simple, PC: Parcial compleja, gen: Generalizada secundariamente. I: Izquierda, D: Derecha; *sin esclerosis.

Caso	Estudio realizado	Edad; género; lado	Edad de inicio; duración (años)	Tipo de crisis	Frecuencia de crisis antes de la intervención	Escala de Engel /años desde la fecha de cirugía hasta 2007
H48	ME; CxT	41; v; I	18; 23	gen	1 semanal	I /12
H57	CxT	27; v; D	13; 14	PC	3 semanales	I /11
H61	CxT; CLG-IV	17; m; D	7; 17	PC	2 semanales	I /11
*H65	AP; ME	21; v; I	14; 7	PC	2-3 semanales	III /11
H67	CxT; CLG-IV	39; v; D	1; 38	gen	1 semanal	I /11
H75	CxT; CLG-IV	37; v; I	13; 24	PC	2 semanales	II /10
H84	CxT	31; v; D	2; 29	gen	4 semanales	I /10
H94	ME; CxT	27; v; I	20; 7	gen	3-5 semanales	II /9
H104	CxT	32; v; I	12; 20	PC	1 semanal	I /9
H108	CxT; CLG-IV	50; v; I	15; 35	gen	4 semanales	III /9
H109	ME; CxT	22; m; D	4; 18	PC	0-3 semanales	I /9
H115	CxT	40; m; I	1.8; 38	gen	4 semanales	III /9
H123	ME; CxT	24; m; I	7; 17	gen	20-25 semanales	I /8
H136	ME; CxT	20; m; D	0.7; 19	gen	0-1 semanal	I /8
H162	AP	44; v; I	4; 40	PC	4-5 semanales	I /6
H164	AP; CLG-IV	27; v; D	1.5; 32.5	gen	1 semanal	I /6
H170	AP	15; m; D	0; 15	PC; gen	1 diaria	I /6
H184	AP	41; v; I	1; 40	gen	2-3 semanales	I /5
H192	AP	26; m; I	11; 15	PC	1 diaria	I /5
*H200	AP; ME	27; v; I	4; 23	PC	1 diaria	III /5
H207	AP	31; m; I	6; 25	PC	2 semanales	I /4
H213	AP	38; v; I	28; 10	PC	3-4 semanales	II /4
H220	AP; CxT; CLG-IV	53; m; I	13; 40	PC	1 semanal	I /4
H225	AP; CxT	49; m; D	16; 33	PC	1 semanal	I /4
H229	AP; CxT; CLG-IV	40; m; D	2; 38	PC	1 semanal	I /4
H230	AP; CxT; CLG-IV	22; m; I	18; 4	PC; gen	1 diaria	III /3
H231	AP; CxT	23; v; I	1; 22	PC; gen	1 diaria	I /3
H233	AP; CxT; CLG-IV	35; v; I	6; 29	PC; gen	1 semanal	III /3
H236	AP; CxT; CLG-IV	54; m; D	16; 38	PC; gen	1 semanal	I /3
H237	AP; CxT; CLG-IV	41; m; I	20; 21	PC; gen	1-2 semanales	I /3
H238	AP; CxT	22; m; D	11; 11	PC	1 semanal	I /3
H239	AP	35; m; I	2; 33	PC	1 semanal	I /3
H240	AP	65; v; I	50; 15	PC; gen	irregular	I /3
H241	AP; CxT; V _v ; CLG-IV	43; m; I	4; 39	PC; gen	irregular	I /3
*H242	AP; ME; V _v	38; m; D	18; 20	PC; gen	1 diaria	I /2
*H248	AP; ME; CLG-IV	45; v; D	17; 28	PS/PC	2 semanales	I /2
*H249	AP	23; m; D	18; 5	PC	1 diaria	I /2

de 20 electrodos (neocorteza lateral) y una tira de 4 electrodos (mesiales). En todos los casos el registro electrocorticográfico intraoperatorio mostraba actividad epileptogénica en los electrodos mesiales. Una vez localizada la zona epileptogénica (foco epileptico) se procede a la resección del tejido. La cirugía suele incluir los ~3,5 cm anteriores del lóbulo temporal. El tejido resecado incluye generalmente los giros temporales medio e inferior, y en ocasiones el giro temporal superior, si presenta actividad interictal intensa.

En la *segunda* etapa se resecan las estructuras mesiales, que incluyen la parte uncal de la amígdala y una porción variable del hipocampo y giro parahipocámpico, que normalmente se limita a su tercio anterior (*vid.* fig. 14; Penfield y Jasper, 1954; Ojeman *et al.*, 1991). Este es el procedimiento quirúrgico del que proceden las biopsias empleadas en este trabajo (Pulido y García de Sola, 1996). La evaluación del resultado quirúrgico se realiza generalmente según la escala propuesta por Engel (Engel, 1987), en función de la frecuencia y las características de las crisis en un periodo de al menos un año tras la cirugía (Tabla 1). Los resultados quirúrgicos son muy variables dependiendo de la selección de los pacientes. En general, los pacientes con esclerosis temporal mesial quedan libres de crisis tras la cirugía en el 50-70% de los casos, mientras que un 10-30% de los pacientes presentan una mejoría significativa, y un 15-30% no mejoran de forma apreciable (Awad y Chelune, 1993)

3.2. PROCESAMIENTO DEL TEJIDO

Las autopsias fueron fijadas 2-3h post mor-

tem y las biopsias inmediatamente tras la resección. El tejido cortical se fijó por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1M con pH 7,4 a 4° C.

A continuación las autopsias y las biopsias fueron seccionadas en pequeños bloques (~1 x 1 x 1 cm) que permanecieron en una nueva solución del mismo fijador durante 24-48 h a 4° C. Una vez fijados, los bloques fueron cortados con Vibratomo en secciones coronales seriadas de 50 µm (hipocampo) ó 100 µm (corteza temporal) de grosor.

3.3. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DEL HIPOCAMPO

El análisis histopatológico estándar se realizó en secciones teñidas mediante el método de Nissl. Se procesaron secciones de los hipocampos procedentes de 5 autopsias y de 37 biopsias obtenidas de la cirugía de la epilepsia.

En todos los casos se verificó que estuviera presente la estructura del hipocampo completa, con todos los campos ammónicos. Las secciones del hipocampo procedentes de las 5 autopsias, fueron examinadas y no se observó ninguna alteración histológica. El análisis reveló la presencia de esclerosis del hipocampo en 32 biopsias. En las otras 5 biopsias no se observó ninguna alteración neuropatológica en la formación del hipocampo, por lo que este tejido fue considerado como no esclerótico (Fig.17, A).

En los hipocampos escleróticos la región CA1 proximal mostraba pérdida neuronal y gliosis severa, en la parte medial de CA1 se observaban células dispersas en la capa piramidal, y la parte más distal limitando con el

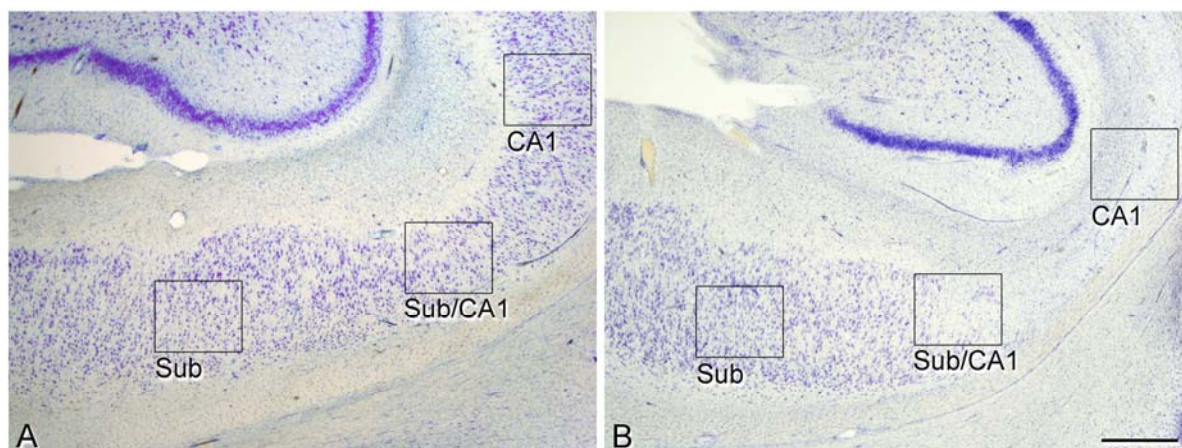


Fig. 17. Microfotografía de la formación de hipocampo humano no esclerótico (A), y esclerótico (B). Los recuadros muestran las áreas analizadas en el estudio: CA1, CA1/ subículo y subículo (*vid.* mayor aumento en Fig. 31). En el hipocampo esclerótico (B) los recuadros indican las áreas: CA1, en la que se observa pérdida neuronal severa y gliosis; CA1/ subículo, donde se puede apreciar el inicio de la pérdida neuronal; y subículo, sin alteraciones aparentes. Barra de escala: 1000 μ m.

subículo tenía un aspecto aparentemente normal. Según este criterio, hemos subdividido el hipocampo esclerótico en 3 zonas: CA1 esclerótico, subículo/CA1 y subículo (Fig.17, B).

3.4. TINCIÓN HISTOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE LA AP

Para detectar la actividad de la fosfatasa alcalina (AP) se utilizó el protocolo descrito por Friede (Friede, 1966), modificado por Fonta e Imbert (Fonta y Imbert, 2002).

Para realizar esta tinción, las secciones obtenidas de la formación del hipocampo (según tabla 1) de las biopsias (n=24) y autopsias (n=5) fueron incubadas en una solución de 100mM Tris-HCl (pH 9.5) con 100mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0.53 mM cloruro de nitrotetrazolio (NBT) y 0.38mM 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato (BCIP). Esta reacción se llevó a cabo durante 10-30 min. a temperatura ambiente y se detuvo transfiriendo las secciones a una solución de 10 mM Tris (pH 7.5) con 1mM EDTA y 10mM levamisol.

Las secciones fueron lavadas en 10 mM Tris (pH 7.5) y montadas en portaobjetos gelatinizados. Posteriormente las secciones fueron deshidratadas, aclaradas con xilol y cubiertas con medio de montaje (DePeX).

Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital (Olympus DP70, Olympus America Inc. Center Valley, PA, EEUU) acoplada a un microscopio (Olympus Bx51, Olympus America Inc. Center Valley, PA, EEUU), usando un programa de adquisición de imagen (Color View, Soft Imaging System). Para generar las figuras se usó Adobe CS3 Extended 10.0.1 (Adobe Systems, San Jose, CA, EEUU).

3.4.1. Análisis cuantitativo

Para realizar el análisis cuantitativo de los capilares teñidos con el marcaje para AP, se utilizó el método descrito por Fonta e Imbert (Fonta y Imbert, 2002). Básicamente, este análisis permite la estimación de la densidad vascular, definida como el área ocupada por los vasos en una unidad de área conocida.

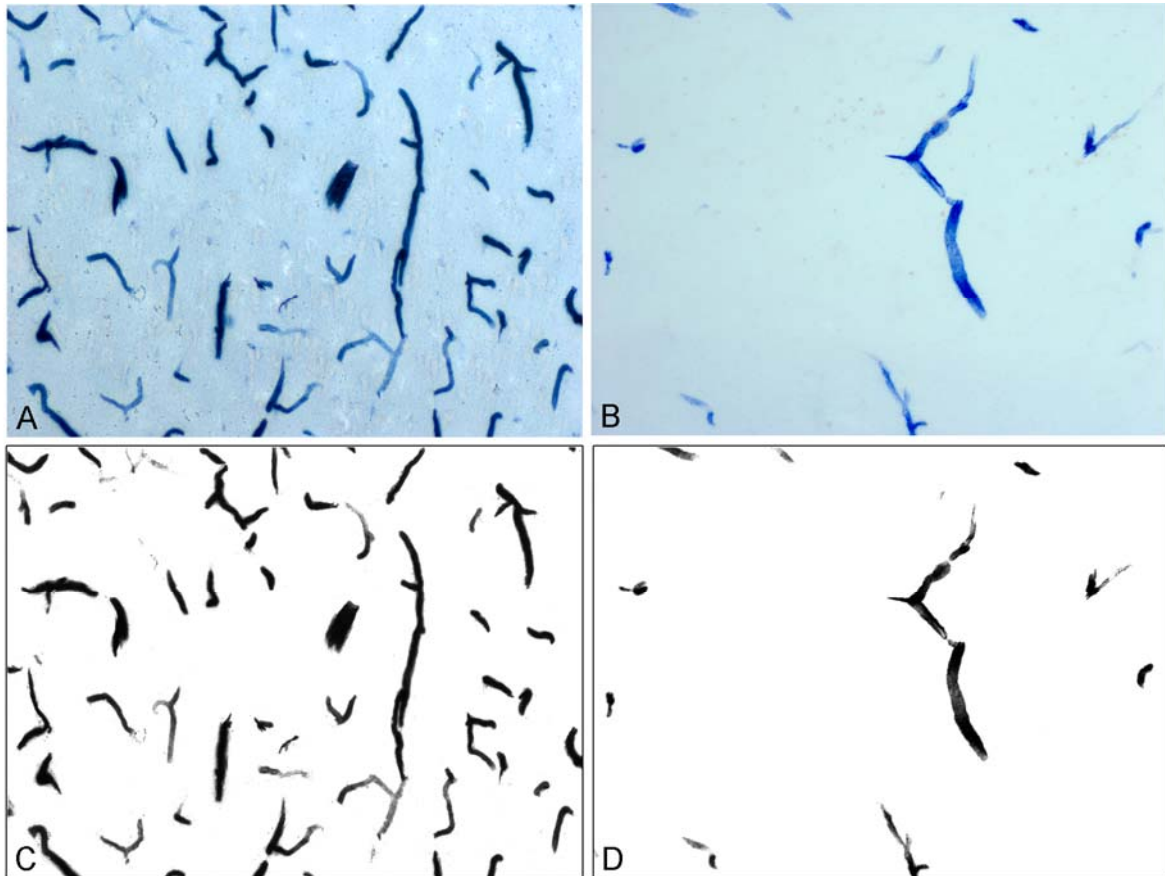


Fig. 18. Imágenes para ilustrar el método de cuantificación de la densidad de vasos marcados para AP. Microfotografías de CA1 marcadas con AP, procedente de un paciente sin esclerosis del hipocampo (A) y con esclerosis (B). C, D: Imágenes convertidas a escala de grises para estimar el porcentaje del área ocupada por los vasos marcados. El programa de análisis de imagen identifica los píxeles en negro, lo que permite calcular el porcentaje del área correspondiente a los vasos marcados para AP.

Todos los campos del hipocampo fueron analizados en 3-4 secciones de cada caso. Las imágenes para el análisis fueron tomadas de secciones coronales del GD, los campos CA1-CA3 y el subículo a un aumento final de 2300x (cada imagen incluía un área de $566768 \mu\text{m}^2$). Las imágenes seleccionadas fueron revisadas y corregidas para disminuir el marcaje del fondo y descartar artefactos. Luego estas imágenes fueron convertidas a escala de grises. De esta manera hemos podido medir sólo el área de los vasos teñidos por AP dado que en la escala de grises se diferenciaban claramente del fondo (Fig. 18). Este muestreo se realizó mediante

un programa de análisis de imagen que identifica los píxeles en negro (Scion Image, Beta 4.0.2, Scion Corporation, NIH, EEUU). El rango de escala de grises fue ajustado manualmente para cada análisis, porque la intensidad de tinción variaba de una sección a otra. A partir de los datos obtenidos se estimó el porcentaje del área ocupada por vasos positivos para AP con respecto al área total de la imagen. Para el análisis estadístico, se compararon cada una de las regiones consideradas. Para ello se aplicó la prueba “T de Student”, utilizando el programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc, EEUU).

3.5. INMUNOHISTOQUÍMICA

Las secciones de hipocampo y corteza temporal, procedentes de autopsias y biopsias se marcaron mediante técnicas inmunohistoquímicas estándar, utilizando diversos anticuerpos según se detallan en la tabla 3. Las secciones fueron procesadas por el método de avidina-biotina acoplado a peroxidasa (Vectastain elite ABC kit standard, Vector), usando un anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG según la procedencia del primario (Tabla 3; dilución 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU). La reacción antígeno-anticuerpo se reveló usando como cromógeno la diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich). Las secciones fueron deshidratadas, aclaradas con xileno y montadas con DePeX. Las microfotografías fueron tomadas con una cámara digital (Olympus DP70) acoplada al microscopio óptico (Olympus,

BX51), usando un programa de adquisición de imagen (Color View, Soft Imaging System), y para crear las figuras se utilizó un software de tratamiento de imágenes (Adobe Photoshop CS3 Extended 10.0.1).

3.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para estudiar el neuropilo a nivel ultraestructural se utilizaron secciones procedentes de biopsias de hipocampos no escleróticos (n=3) y escleróticos (n=4), previamente procesadas o no para inmunohistoquímica (*vid.* apartado 3.5). Las secciones fueron tratadas con 1% de tetróxido de osmio y 7% de glucosa en PB 0.1M, y deshidratadas en pasos sucesivos de concentraciones crecientes de alcoholes. Seguidamente se incubaron en una mezcla de acetona-araldita (1:1) durante 1 h, después se dejaron una noche en araldita pura. Al día siguiente, se traspasaron los

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en los marcajes inmunohistoquímicos.

Anticuerpo primario	Dilución	Casa comercial
NeuN, proteína específica nuclear de neurona (monoclonal, ratón)	1: 2000	Chemicon, Temecula, CA, EEUU
GFAP, proteína ácida fibrilar glial (policlonal, cabra)	1: 400	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EEUU
LN3, antígeno de leucocitos humanos, marcador de microglia activada (monoclonal, ratón)	1: 12	MP Biomedicals, Inc, Ohio, EEUU
GAT-1, transportador de GABA de tipo I (policlonal, conejo)	1: 500	Chemicon, Temecula, CA, EEUU
VGAT, transportador vesicular de GABA (policlonal, conejo)	1: 2000	Synaptic systems, GmbH, Gottingen, Alemania
VGLUT-1, transportador vesicular de glutamato de tipo I (policlonal, cobaya)	1: 5000	Chemicon, Temecula, CA, EEUU
CLG-IV, Colágeno de tipo IV (monoclonal, ratón)	1:1000	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU

cortes a araldita pura nueva, durante 3 horas a temperatura ambiente. La araldita pura se preparó a partir de una mezcla de: Araldita 502 (10 gr), DDSA (8 gr), BDP (0.3 ml), BDMA (0.5 ml) (todos ellos de TAAB Laboratorios, Inglaterra, GB). Tras este proceso, los cortes se montaron en plano en portas siliconizados, cubiertos con una lámina de plástico. Una vez montados de esta manera, se dejaron polimerizar a 60°C durante 48h, colocando unos pesos encima con el fin de obtener una inclusión lo más plana posible (método descrito por DeFelipe y Fairén, 1993).

Una vez incluidos los cortes, éstos fueron estudiados con el microscopio óptico para seleccionar la zona para analizar con el microscopio electrónico. Una vez elegida la región de interés, se obtuvieron cortes semifinos seriados de 2 µm de grosor, utilizando un ultramicrotomo de Leica EM UC6 (Leica Microsystems GMBH, Wetzlar, Alemania). Los cortes semifinos fueron contra-teñidos con azul de toluidina al 0.5 % en 1% Borax, y examinados con el microscopio óptico, para seleccionar el área de interés. A continuación, fueron fotografiados con el fin de llevar a cabo la correlación óptico-electrónica, que permite localizar en el microscopio electrónico las mismas regiones visualizadas mediante el microscopio óptico en el corte semifino (Figs. 28, 29, 32, 33, 34; DeFelipe y Fairén, 1993). Dichos cortes semifinos se utilizaron para obtener los cortes ultrafinos. Los ultrafinos seriados obtenidos fueron de color gris plateado, que correspondía a un grosor de 60-70nm (Peachey, 1958). Las secciones ultrafinas eran recogidas en rejillas con un único ojal y

membrana de formvar, teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo, y examinadas con un microscopio electrónico JEOL 1200 EX (JEOL EEUU, Inc., Peabody, MA, EEUU). Las imágenes fueron tomadas con cámara digital acoplada al microscopio electrónico (Mega View III Side-mounted TEM Camera, Soft Imaging System GmbH, Alemania) y usando un programa de adquisición de imagen analiSIS (analiSIS 3.2, Soft Imaging system GmbH, Alemania).

Igualmente, se estudiaron las características de los vasos marcados con CLG-IV en CA1, mediante el método de correlación óptico-electrónico. Para ello se analizaron 16 secciones semifinas (2 µm), de tejido no esclerótico (n=3) y esclerótico (n=5). En total, fueron estudiados 67 vasos sanguíneos normales y 54 con apariencia alterada.

3.7. ESTIMACIÓN DE LA FRACCIÓN DE VOLUMEN DE LOS VASOS SANGUÍNEOS

Para estimar la fracción de volumen (V_V) ocupada por los vasos sanguíneos, independientemente de su inmunoreactividad para el CLG-IV o su marcaje para AP, se utilizaron secciones de 50 µm adyacentes a las utilizadas para el estudio histológico (2-3 secciones por caso). Estas secciones se incluyeron en resinas (*vid.* apartado 3.6) para la obtención de secciones semifinas de 2 µm, de la región CA1, tanto de hipocampos no escleróticos como de escleróticos. En cada caso, una media de 33 secciones semifinas (con un rango de 26-40), que correspondían a una superficie de 100-300 mm², fueron estudiadas para estimar la V_V ocupada por los vasos sanguíneos, mediante conteo de puntos aplicando el método de Cavalieri (Fig. 19;

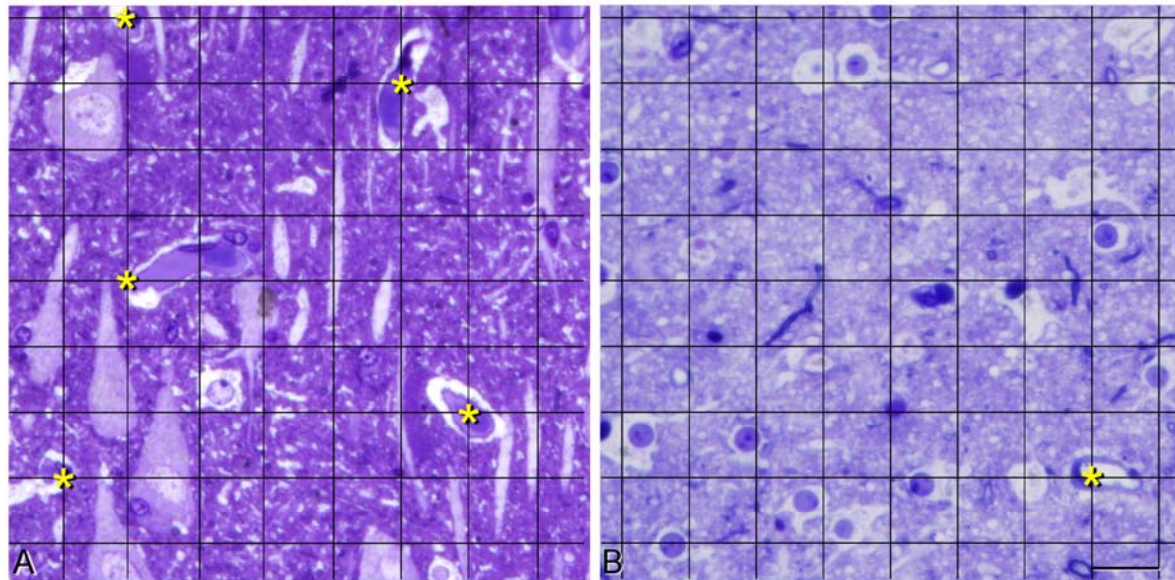


Fig. 19. Microfotografías para mostrar el método de Cavalieri, utilizado para estimar la fracción de volumen (V_v) ocupada por vasos sanguíneos. **A:** Tejido control; **B:** Tejido esclerótico. Se utilizó una gradilla con pequeñas intersecciones, superpuesta al tejido, en la que cada intersección tiene un área asociada de $20 \times 20 = 400 \mu\text{m}^2$. El número de intersecciones que coinciden con vasos, indicadas con asteriscos amarillos (en control $n=5$, $5 \times 400 = 2000 \mu\text{m}^2$; y en esclerótico $n=1$, $400 \mu\text{m}^2$), en el tejido control es mayor que en el tejido esclerótico. Barra de escala: $20 \mu\text{m}$.

Gundersen *et al.*, 1988). La fracción de volumen ocupada por vasos (V_v) se calculó según la fórmula:

$$V_v = \frac{100 \times (\text{n}^\circ \text{ de intersecciones con vasos} \times A_a)}{(\text{n}^\circ \text{ de intersecciones totales} \times A_a)}$$

Donde A_a es el valor del área asociada a cada punto de intersección.

Los vasos sanguíneos fueron contados sólo cuando se podía identificar claramente el lumen de los vasos y las células endoteliales. El conteo se efectuó usando un programa de estereología CastGrid (Olympus, 2000, Dinamarca) acoplada a un microscopio óptico (Olympus, BX51).

Las comparaciones estadísticas de datos se hicieron aplicando la prueba “T de Student” para muestras independientes, con ayuda del

programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Prism 4, GraphPad Prism Software, Inc).

3.8. ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD SINÁPTICA

El análisis cuantitativo para estimar el número de sinapsis por volumen, se realizó en el neuropilo del estrato *piramidale* de las regiones de interés: CA1 y subículo. El neuropilo se escogió evitando cuerpos celulares, dendritas de gran diámetro y vasos sanguíneos. En cada caso y región considerada para el estudio se tomaron 25 microfotografías con el microcopio electrónico JEOL 1200 EX a un aumento de $30000\times$, que permitía la identificación de los distintos tipos de sinapsis (*vid.* Fig. 7).

En el tejido estudiado se identificaron los dos tipos morfológicos de sinapsis cortica-

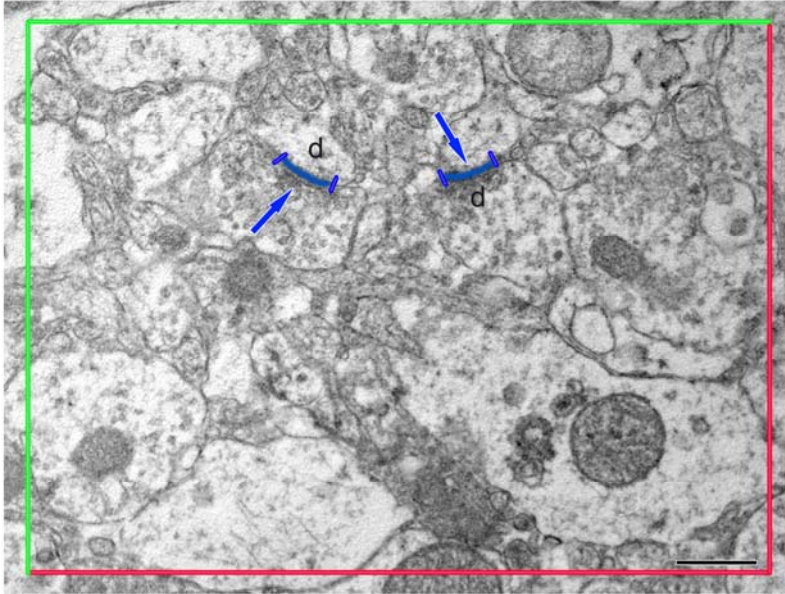


Fig. 20. Microfotografía de microscopía electrónica para ilustrar el método estereológico para el estudio de la densidad sináptica por volumen según el método de “frecuencia de los tamaños” (*Size-frequency*). Las flechas indican las sinapsis. En cada sinapsis, la medida de la longitud de la densidad postsináptica (trazo, flecha) se consideró como la longitud del contacto sináptico (d). Los bordes de inclusión y exclusión se han representado en verde y rojo, respectivamente. Barra de escala: 0,463 μm .

les: sinapsis asimétricas (o de tipo I) y simétricas (o tipo II). Hemos calificado como “no caracterizadas” las sinapsis en las que no se pudo visualizar claramente el espacio intersináptico o/y las densidades postsinápticas (Bourgeois y Rakic, 1993; Bourgeois *et al.*, 1994; DeFelipe *et al.*, 1999b). En cada región estudiada, en el número total de sinapsis se consideraron las sinapsis simétricas, las asimétricas y las no caracterizadas. Las sinapsis no caracterizadas fueron repartidas e incluidas en el cálculo final de las densidades de las sinapsis asimétricas y simétricas, según la frecuencia de cada uno de estos tipos de sinapsis. Es decir, la proporción de cada tipo de sinapsis es una estimación real del total de las sinapsis estudiadas (DeFelipe *et al.*, 1999b; Alonso-Nanclares *et al.*, 2008).

El número de sinapsis por volumen (N_v) se ha estimado usando el método de la frecuencia de los tamaños, ya que este método es más eficaz y preciso que el del disector (Fig 20; *Size-frequency method*, DeFelipe *et al.*, 1999b). Este método se basa en la siguiente fórmula:

$$N_v = N_a / d$$

Donde “ N_a ” es el número de sinapsis por unidad de superficie, y “ d ” es la longitud media de los contactos sinápticos.

Dicha longitud, fue medida sobre las imágenes obtenidas digitalmente, usando el programa de análisis ImageJ (ImageJ 1.34s, Wayne Rasband, National Institutes of Health, EEUU). El análisis estadístico de los datos se hizo con ayuda del programa de estadística GraphPad Prism.

RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LA VASCULARIZACIÓN DEL HIPOCAMPO

4.1.1. Análisis de la microvascularización mediante el marcaje para la AP

El marcaje de AP reveló numerosos vasos sanguíneos en todos los campos de la forma-

ción del hipocampo no esclerótico.

En los campos amnónicos el marcaje de AP mostró numerosos capilares localizados principalmente en el estrato *piramidale*, mientras que en los estratos *alveus*, *oriens* y *radiatum* los capilares eran menos numerosos (Fig. 21).

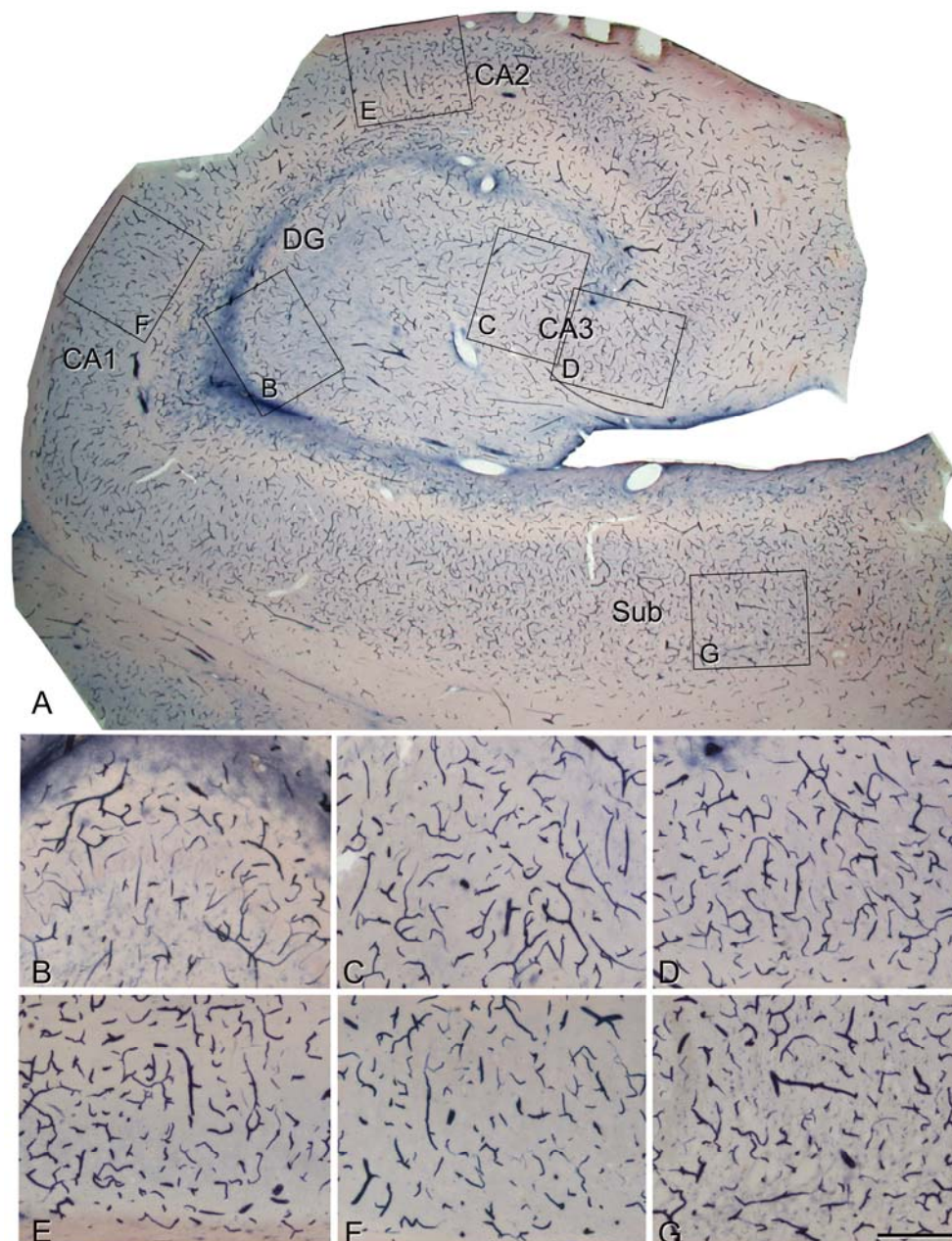


Fig. 21. Formación del hipocampo no esclerótico procedente de un paciente con ELT marcado mediante el método histoquímico para la fosfatasa alcalina (AP). **A:** Microfotografía a bajo aumento para ilustrar el marcaje de AP en los diferentes campos CA y complejo subicular. **B-G:** Se muestran a mayor aumento las regiones delimitadas por recuadros en A, que corresponden a giro dentado (B), CA3 (C, D), CA2 (E), CA1 (F) y subículo (G). Sub: subículo. Barra de escala: 1000 μ m en A, 300 μ m en B-G.

El marcaje de AP en el subículo reveló numerosos capilares en la capa piramidal, mientras que en el giro dentado las capas con más capilares fueron las molecular y polimorfa, presentando la capa granular una densidad muy baja de capilares.

El marcaje de AP en los hipocampos escleróticos reveló un patrón de marcaje muy diferente al de los hipocampos no escleróticos, donde se podía apreciar una disminución llamativa del número de vasos principalmente en CA1. El marcaje en el subículo era similar al de los hipocampos procedentes de autopsias y biopsias no esclerótico (Fig. 22). Además, en el presente estudio se ha estimado la densidad de vasos marcados por AP en los estratos *piramidale* y *radiatum* en los diversos campos de CA, la capa piramidal en el subículo y las capas molecular, granular y polimorfa de GD en autopsias y biopsias.

Hemos comparado la densidad por área de los capilares marcados por la AP (en los campos CA, en el subículo y en el giro dentado) de las secciones obtenidas de los hipocampos procedentes de las autopsias, y de los procedentes de las biopsias, tanto no es-

cleróticos, como escleróticos (Fig. 23). El análisis de la densidad de vasos reveló diferencias estadísticamente significativas en CA1, donde se observó una reducción del 70% y 60% del área ocupada por vasos en comparación con los hipocampos no escleróticos e hipocampos procedentes de autopsias respectivamente (Tabla 4). No se encontraron diferencias significativas en las regiones CA2 y CA3, el subículo y en giro dentado (Fig.23; Tabla 4).

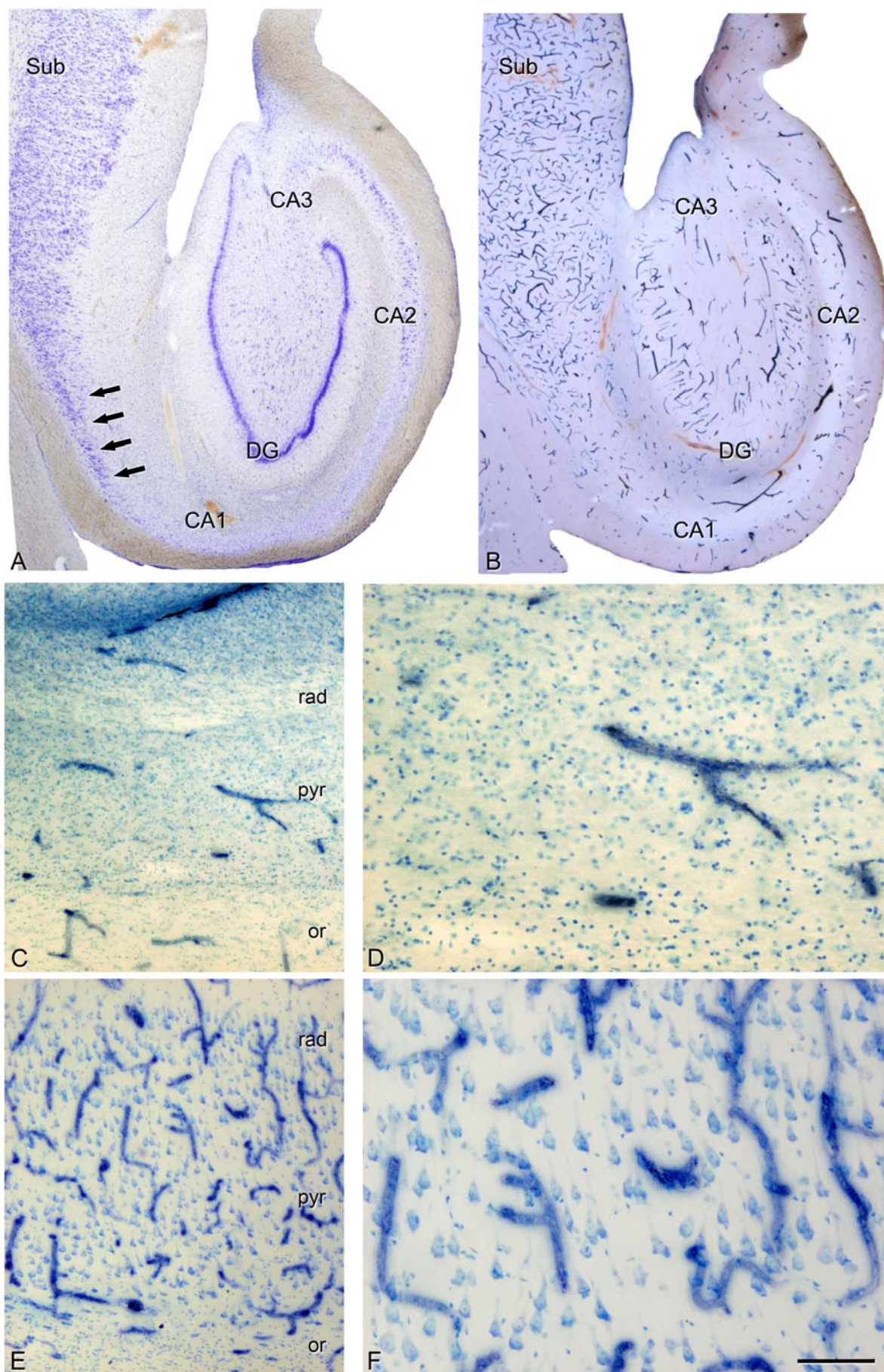
4.1.2. Análisis de la microvascularización mediante el marcaje para colágeno-IV

El marcaje de microvascularización por el método inmunohistoquímico para CLG-IV reveló numerosas estructuras vasculares, que al ser observadas a bajos aumentos presentaban un patrón aparentemente similar tanto en hipocampos escleróticos, como no escleróticos, con la excepción de CA1 esclerótico, que presentaba una mayor densidad de elementos marcados (Fig. 24).

El análisis de la densidad de vasos marcados con CLG-IV en los estratos piramidal y radiatum de CA1 de secciones procedentes de autopsias y de pacientes con ELT, mostró

Fig. 22. Secciones de hipocampo esclerótico de un paciente epiléptico teñidas mediante el método de Nissl e histoquímico para AP. **A:** Microfotografía de una sección teñida por el método de Nissl para ilustrar la pérdida neuronal en todos los campos del hipocampo con la excepción del subículo. Las flechas muestran neuronas de la capa piramidal que sobreviven en la región en transición entre CA1 y subículo, en la que se puede observar como desaparecen de forma progresiva cerca de CA1. **B:** Microfotografía de una sección adyacente a la anterior para ilustrar el marcaje con AP. **C-F:** Microfotografías a mayor aumento de secciones de hipocampo marcadas para AP y contrateñidas mediante el método de Nissl. **C:** Microfotografía de un hipocampo esclerótico, que muestra escasos vasos sanguíneos marcados por AP, lo que coincide con una pérdida neuronal severa y gliosis. **D:** Detalle de C para ilustrar la presencia de numerosas células gliales y escasos vasos sanguíneos positivos para AP. **E:** Microfotografía de un hipocampo no esclerótico, que muestra un gran número de vasos sanguíneos marcados por AP y numerosas neuronas. **F:** Detalle de E, para ilustrar la presencia de células piramidales en la capa piramidal de CA1 y varios vasos sanguíneos marcados por AP. or: *oriens*; pyr: *piramidale*; rad: *radiatum*; Sub: subículo. Barra de escala: 900 µm en A, B, 300 µm en C, E y 100 µm en D, F.





RESULTADOS

una densidad similar en el tejido de autopsias y en hipocampos no escleróticos. Sin embargo, la densidad del hipocampo esclerótico (media \pm sem, 24.3 \pm 2.67), fue significativamente mayor ($p=0.02$) que la encontrada en el tejido no esclerótico (9.4 \pm 0.25). Es decir, que el tejido esclerótico mostraba un aumento de un 160% en la densidad de vasos marcados con CLG-IV en CA1 (Fig.

24). Estos resultados, coincidirían con el incremento en la densidad de vasos que se ha reportado en tejido de hipocampo de pacientes con ELT mediante el marcaje para el factor de crecimiento endotelial y los receptores de tirosin-kinasa (Rigau *et al.*, 2007). No obstante, el análisis detallado de los vasos sanguíneos marcados por CLG-IV reveló alteraciones en la apariencia de estos ele-

Tabla 4. Densidades vasculares (porcentaje de área ocupada por vasos AP- positivos, promedio \pm SEM) y comparación estadística entre hipocampos autopsia, no esclerótico y esclerótico.

Región	Autopsia	No esclerótico	Esclerótico	Autopsia vs. no esclerótico	Autopsia vs. esclerótico	No esclerótico. vs. esclerótico
GD	10.51 \pm 1.55	12.81 \pm 1.59	10.10 \pm 1.13	ns	ns	ns
CA3	12.42 \pm 2.80	11.90 \pm 2.33	9.95 \pm 0.96	ns	ns	ns
CA2	16.32 \pm 2.84	10.61 \pm 4.98	11.42 \pm 1.67	ns	ns	ns
CA1	13.99 \pm 2.35	10.75 \pm 2.78	4.14 \pm 0.37	ns	0.001	0.001
Subiculo	13.98 \pm 3.04	14.8 \pm 2.13	17.44 \pm 1.15	ns	ns	ns

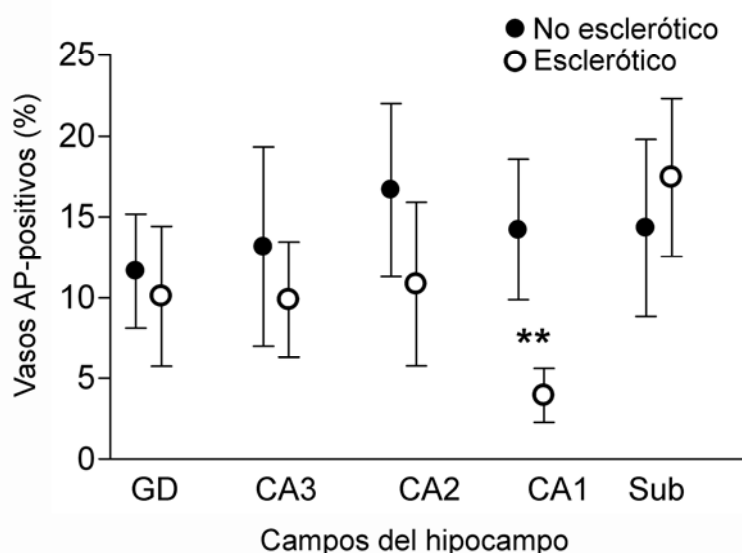


Fig. 23. Representación gráfica de la densidad relativa de vasos sanguíneos marcados mediante la tinción histoquímica para AP en los diferentes campos amnónicos del hipocampo. La densidad se expresa como el porcentaje de área ocupada por vasos sanguíneos por unidad de área. Las comparaciones estadísticas mostraron diferencias significativas solamente en CA1. ** $P<0.01$. Sub: subículo.

mentos marcados en el estrato *piramidale* de CA1 del hipocampo esclerótico (Fig. 25). Estos vasos presentaban alteraciones en su superficie, con numerosas pequeñas proyecciones parecidas a espinas, mientras que en la región CA1 de hipocampos no escleróticos estos elementos presentaban una superficie lisa (Fig. 25 A, C, E). Estas protrusio-

nes confieren una apariencia “espinosa” a los vasos sanguíneos localizados en CA1 esclerótico (Fig. 25 B, D, F). Además, aparecían numerosas estructuras vasculares tubulares anómalas que mostraban una apariencia vacuolar o reticulada (Fig. 25 G). Las alteraciones morfológicas de este tipo eran frecuentes en el área de transición entre

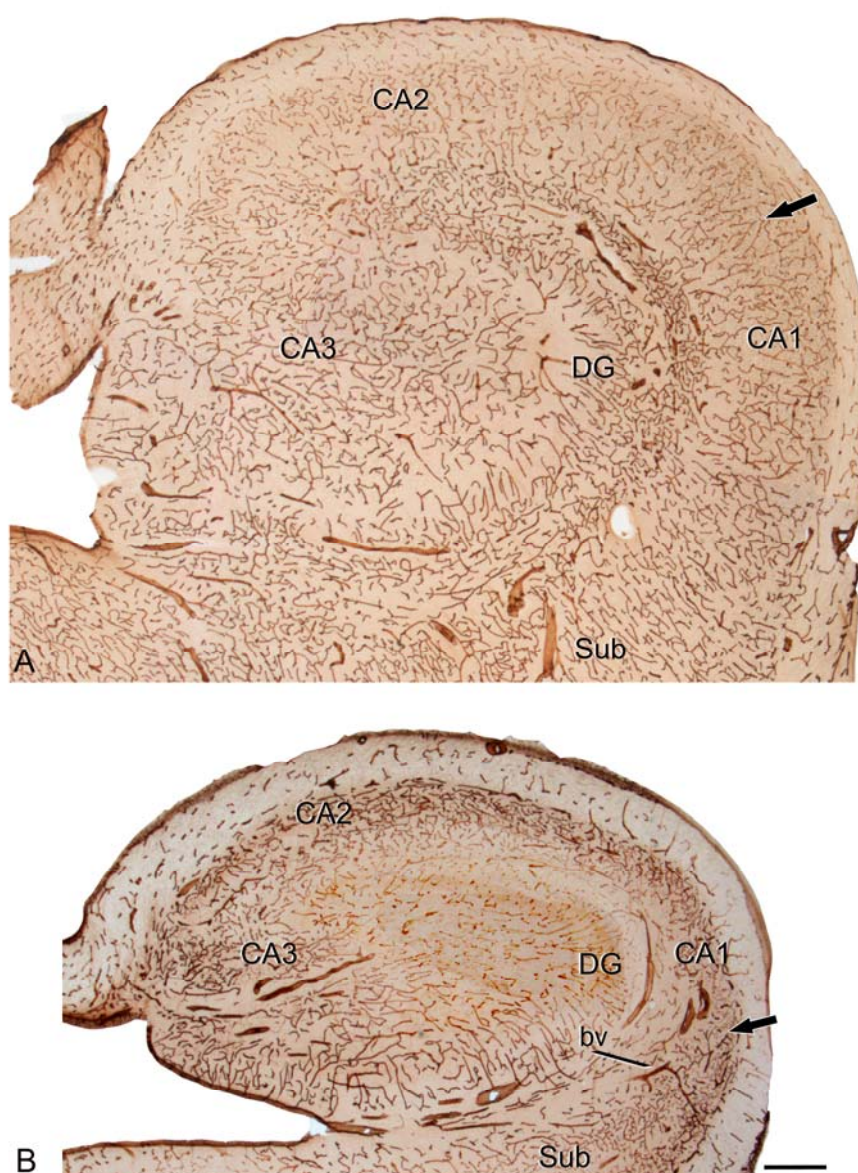


Fig. 24. Microfotografías de secciones con marcaje inmunohistoquímico para CLG-IV, en hipocampo control (A) y esclerótico (B). Nótese el menor tamaño de la formación de hipocampo esclerótico al comparar con el hipocampo control debido a la atrofia del hipocampo esclerótico. Las flechas indican áreas de CA1 mostradas a mayor aumento en Fig. 25 A, B. bv, indican los mismos vasos sanguíneos mostrados a mayor aumento en Fig. 26 A, B. Sub: subículo. Barra de escala: 500 μ m .

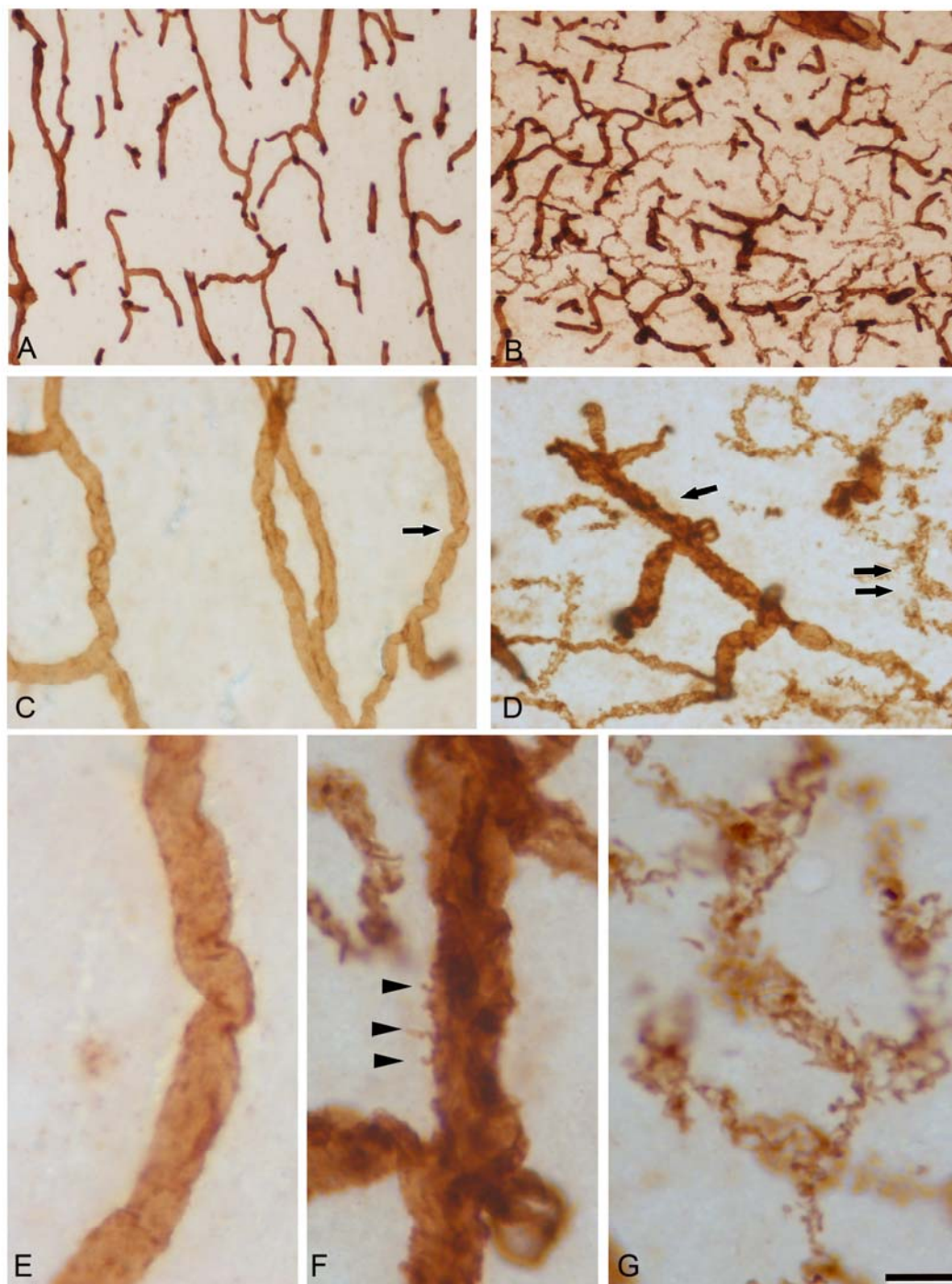


Fig. 25. Microfotografías de la región de CA1 de un hipocampo no esclerótico (A) y de un hipocampo esclerótico (B) para ilustrar el incremento de los elementos marcados con CLG-IV en el tejido esclerótico. C, D: Detalles de CA1 de hipocampo no esclerótico (C) y esclerótico (D), señalados con flechas en Fig. 24 A, B, respectivamente, para ilustrar las modificaciones morfológicas de los vasos sanguíneos en hipocampo esclerótico. E: Mayor aumento del vaso sanguíneo indicado por una flecha en C, para mostrar la superficie lisa de los vasos en el tejido control. F: Detalle del vaso sanguíneo marcado con una flecha en D, para ilustrar la presencia de pequeñas protrusiones, con forma de espinas en la superficie de los vasos sanguíneos (puntas de flechas). G: Mayor aumento del área marcada con dos flechas en D, para ilustrar la presencia de estructuras vasculares anómalas, de tipo tubular y con apariencia vacuolar o reticulada. Barra de escala: 90 μ m en A, B, 30 μ m en C, D, y 10 μ m en E-G.

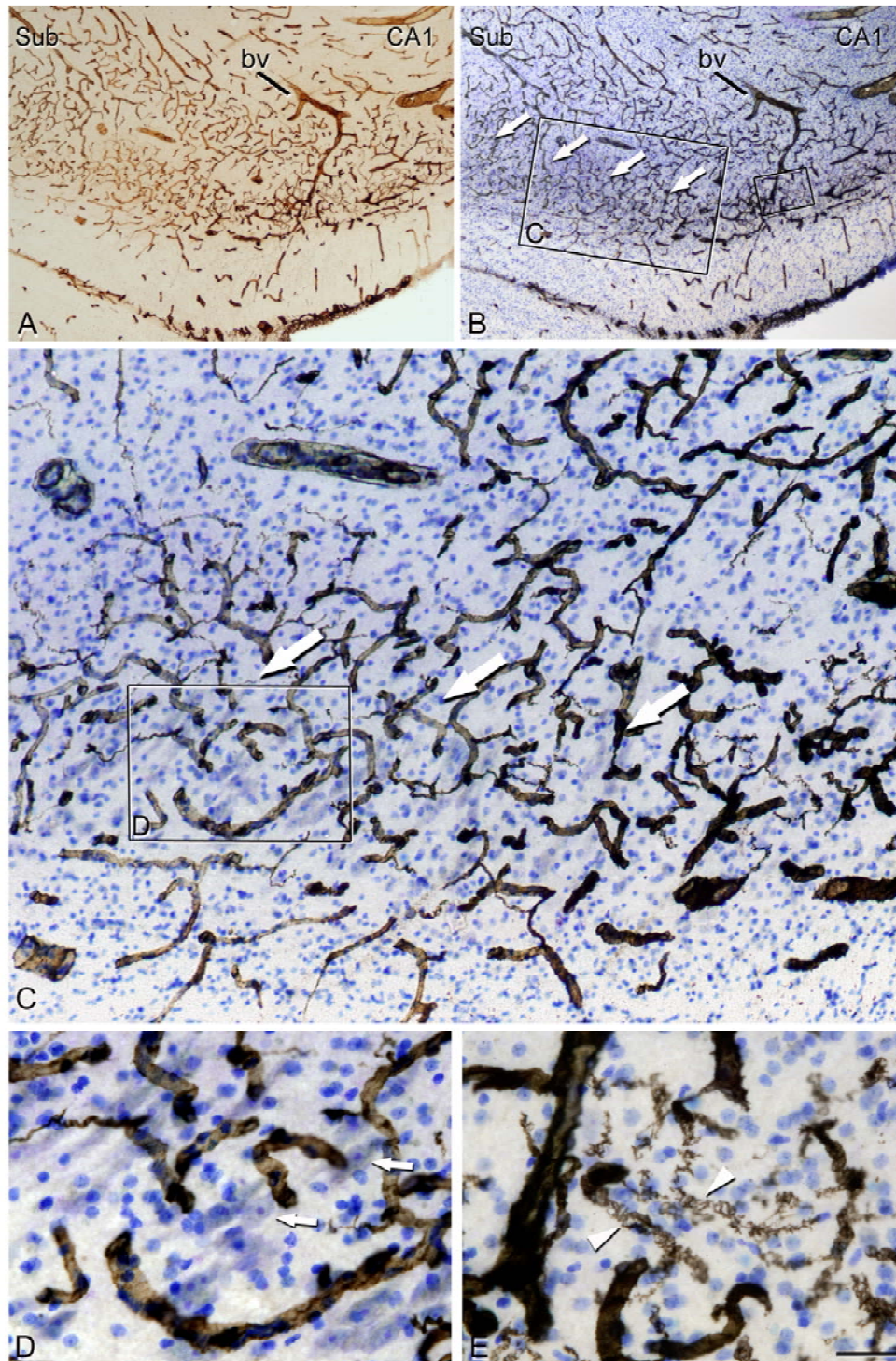


Fig. 26. A, B: Microfotografías de una sección marcada para CLG-IV antes (A) y después de la contratinción mediante el método de Nissl (B). bv: indica el mismo vaso sanguíneo señalado en la fig. 24 B. **C:** Mayor aumento del área recuadrada en B, para ilustrar los vasos sanguíneos marcados y la presencia de neuronas y células gliales. Las flechas (en B y C) indican neuronas piramidales que sobreviven en el área de transición entre CA1 y subículo (ver fig. 21A). **D:** Detalle del área recuadrada en C, que ilustra la presencia de vasos sanguíneos normales, adyacentes a neuronas de aspecto normal (flechas). **E:** Detalle de área del recuadro pequeño en B, para ilustrar vasos sanguíneos con alteraciones morfológicas (puntas de flechas), que coinciden con las regiones de gliosis y pérdida neuronal, en CA1 medial. Sub: subículo. Barra de escala: 300 μ m en A, B, 60 μ m en C y 30 μ m en D, E.

CA1 y subículo.

La contratinción mediante el método de Nissl de las secciones marcadas con CLG-IV mostró que las estructuras vasculares anómalas de aspecto reticulado eran especialmente abundantes en las regiones con pérdida neuronal y gliosis severa, como sucede en la parte medial de CA1, mientras en otros campos del hipocampo, que presentaban pérdida neuronal y gliosis moderada, estas estructuras aparecen escasamente (Fig. 26).

4.1.3. Estimación de la fracción de volumen de los vasos sanguíneos

Para estimar la fracción de volumen (V_v) ocupada por vasos sanguíneos, independientemente de la actividad de AP o marcaje inmunohistoquímico para CLG-IV, hemos usado secciones semifinas de 2 μm de grosor teñidas con 1% de azul de toluidina para visualizar los vasos sanguíneos en el campo CA1 tanto de hipocampo control, como de

esclerótico, y para realizar análisis cuantitativo usando el método de Cavalieri (*vid.* apartado 3.7; Fig. 19).

En el campo CA1 control se observaron numerosos vasos sanguíneos (Fig. 27 A) y el promedio de su V_v ocupado fue 2,51%, mientras en el campo CA1 esclerótico los vasos sanguíneos fueron poco frecuentes (Fig. 27 B), con un V_v de solo un 0,96%, lo que representaba una disminución de un 60% con respecto al control. Por lo tanto, la disminución de vasos sanguíneos marcados con AP en CA1 esclerótico coincidía con la reducción en la V_v ocupada por vasos sanguíneos encontrada en esta región.

4.1.4. Análisis ultraestructural de la vascularización

La región CA1 del hipocampo no esclerótico e hipocampo esclerótico fue estudiada con el método de correlación de microscopía óptica y electrónica (Figs. 28; 29).

Los vasos sanguíneos de CA1 de los hipo-

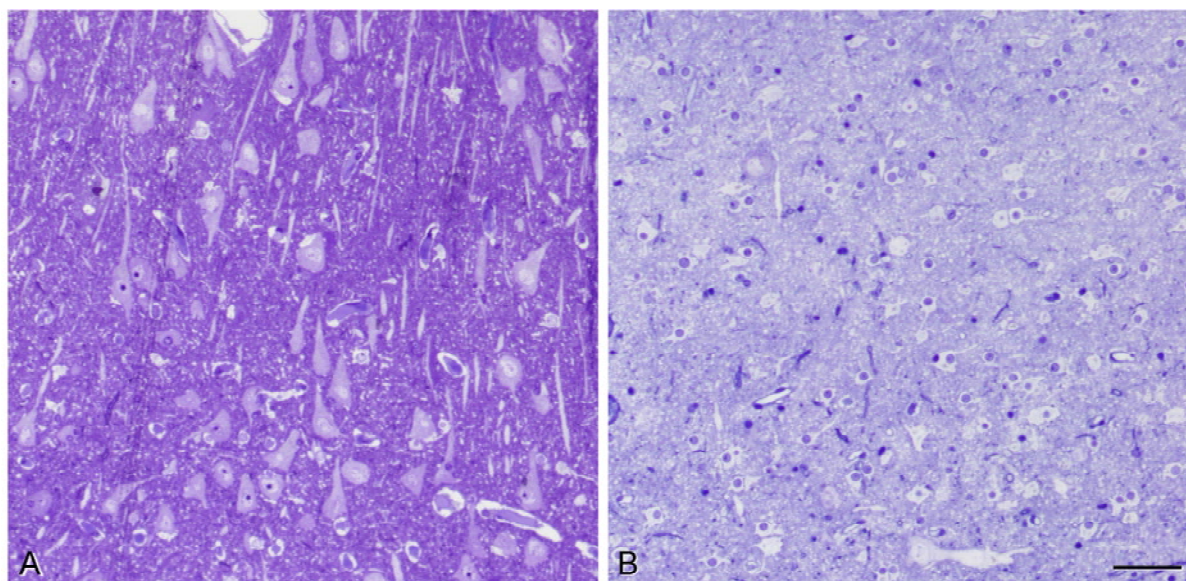


Fig. 27. Microfotografías panorámicas de secciones semifinas (2 μm) teñidas con 1% de azul de toluidina, de CA1 no esclerótico (A) y esclerótico (B). Nótese la disminución de células piramidales y vasos, y el aumento de células gliales en CA1 esclerótico al comparar con el CA1 no esclerótico. Barra de escala: 50 μm .

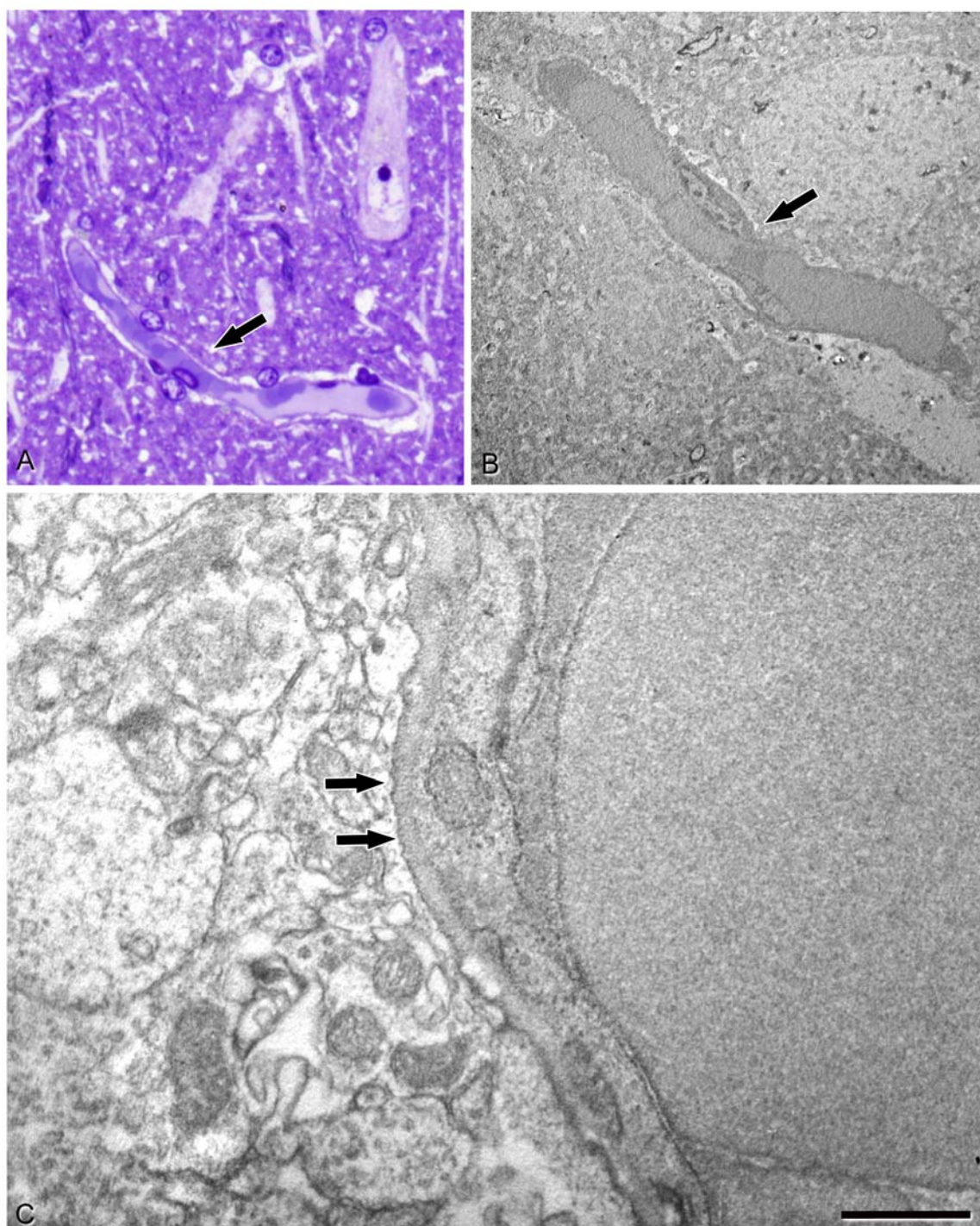


Fig. 28. Correlación de microscopía óptica y electrónica de vasos sanguíneos en CA1 de hipocampo no esclerótico. **A:** Microfotografía de sección semifina de 2 μm de grosor, teñida con toluidina, que muestra un vaso sanguíneo normal (flecha). **B:** Microfotografía obtenida con el microscopio electrónico a bajo aumento que ilustra un vaso sanguíneo normal (flecha). **C:** Mayor aumento de B para mostrar la morfología normal del vaso sanguíneo, con una presenta superficie lisa (flechas). Barra de escala: 30 μm en A, 8 μm en B y 0.4 μm en C.

RESULTADOS

campos no escleróticos estudiados mediante microscopia electrónica, presentaban un aspecto normal (Fig. 28), mientras que los de los hipocampos escleróticos tenían alteraciones similares a las observadas en el microscopio óptico. La superficie de numerosos vasos sanguíneos mostraba irregularidades en la lámina basal, que eran responsables de la apariencia espinosa de los vasos en esta región (Fig. 29 C-D). En particular,

las estructuras vasculares marcadas con CLG-IV que mostraban una apariencia vacuolar, al ser examinadas en el microscopio electrónico resultaron ser ramas atrofiadas de vasos sanguíneos (Fig. 30 A, B), cuyo lumen se había reducido casi por completo al estar ocupándolo prolongaciones de astrocitos reactivos (Fig. 30 C, D), además se podía apreciar un engrosamiento de la lámina basal (Fig. 30 D).

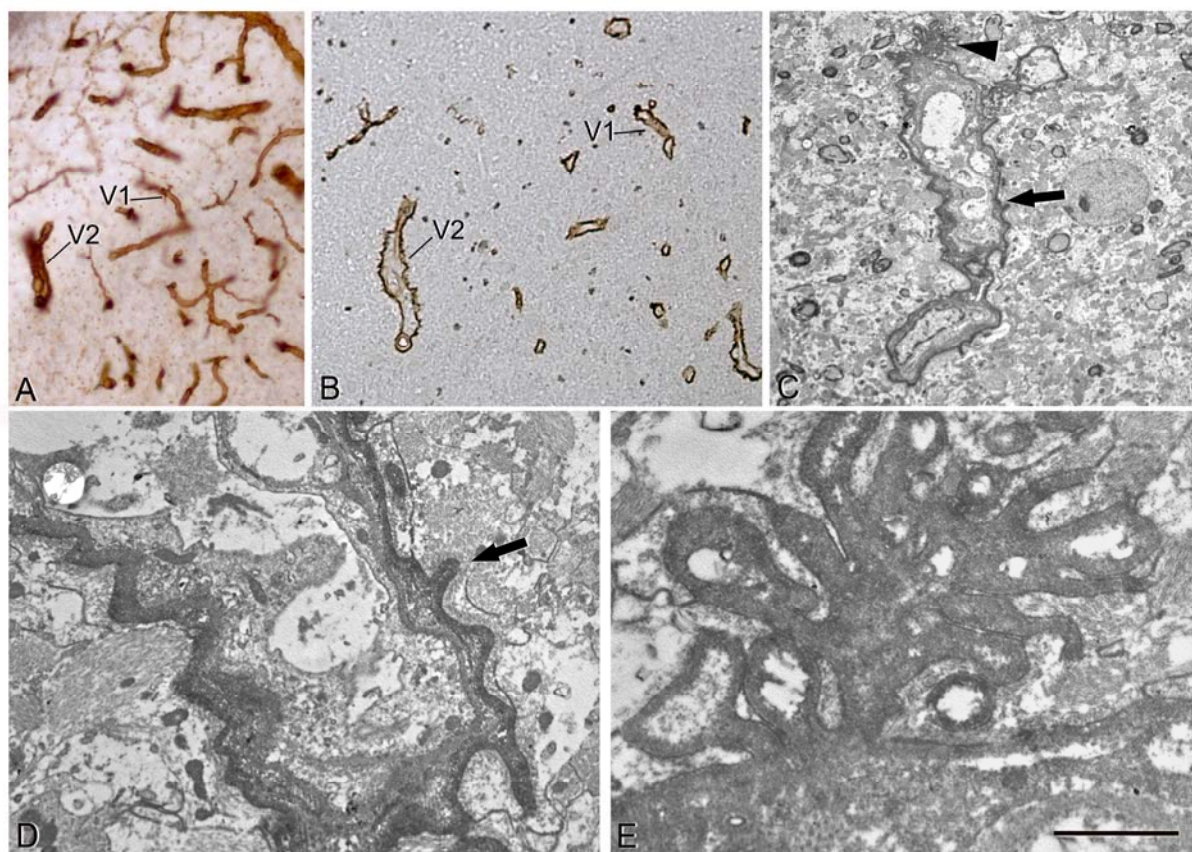


Fig. 29. Microfotografías de la correlación de microscopia óptica y electrónica de vasos sanguíneos marcados por CLG-IV en CA1 del hipocampo esclerótico. **A:** Microfotografía de una sección teñida inmunohistoquímicamente para CLG-IV. **B:** Microfotografía de una sección semifina de 2 µm de grosor, obtenida de la sección A. V₁ y V₂ indican los mismos vasos sanguíneos en A y en B. **C:** Microfotografía obtenida con el microscopio electrónico a bajo aumento, tomada de una sección ultrafina obtenida al resecar la sección semifina anterior (B), donde se observa el vaso sanguíneo V₁. La flecha indica pequeñas protrusiones en forma de espina en la superficie del vaso sanguíneo, la punta de flecha señala una rama atrófica. **D:** Mayor aumento de C para ilustrar la misma protrusión indicada con una flecha en C. **E:** Detalle de la rama atrófica marcada con una punta de flecha en C. Barra de escala: 150 µm en A, 75 µm en B, 10 µm en C, 2,5 µm en D, 9 µm en F y 1 µm en E.

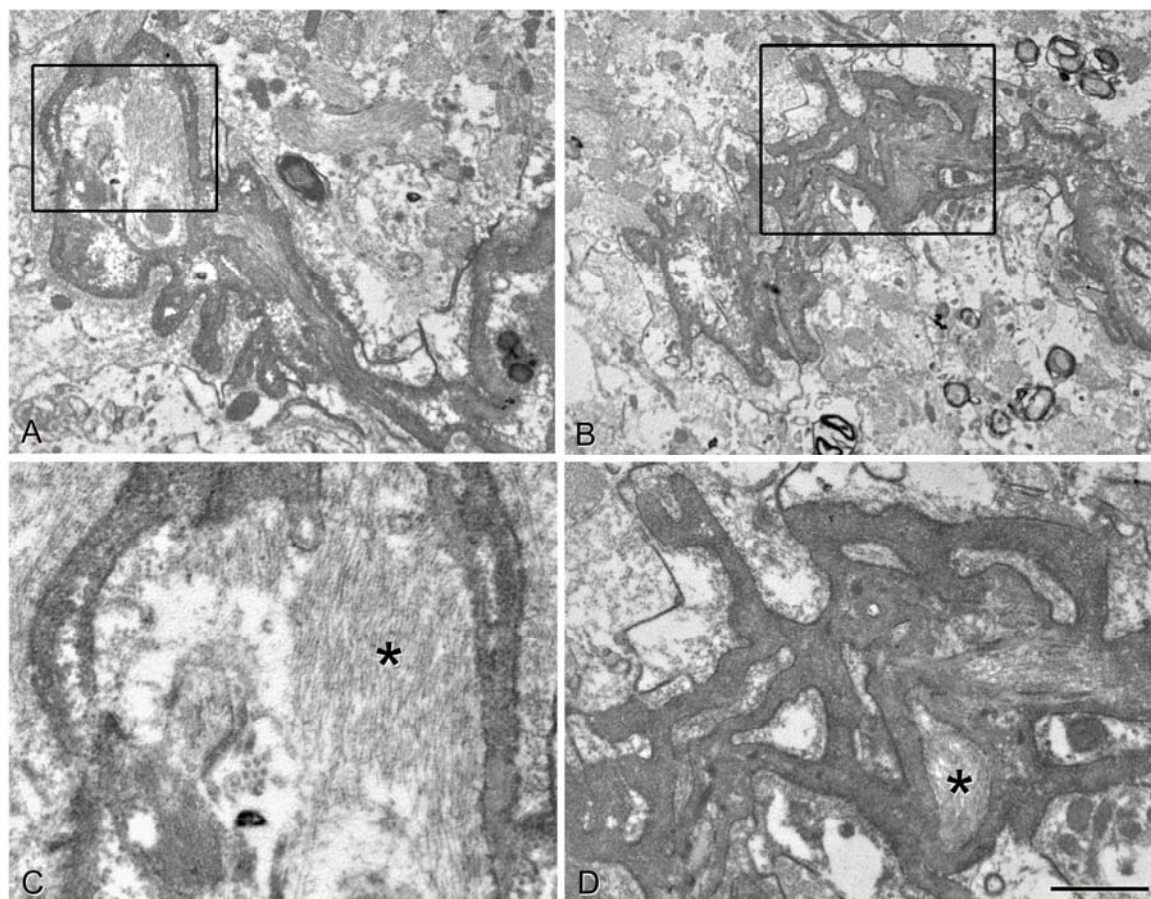


Fig. 30. Detalles de ramas atróficas de vasos sanguíneos en CA1 de hipocampos escleróticos. **A, B:** Bajo aumento de vasos atróficos marcados con CLG-IV. **C, D:** Detalle de las áreas recuadradas en A y B. Los asteriscos señalan astrocitos reactivos dentro de los vasos sanguíneos atróficos. Barra de escala: 1,4 μm en A, 2 μm en B, 0,5 μm en C y 1,4 μm en D.

4.2. ESTUDIO DE LOS CIRCUITOS SINÁPTICOS EN EL HIPOCAMPO

4.2.1. Análisis histopatológico del hipocampo

El análisis histopatológico de los hipocam-

pos estudiados se realizó mediante la tinción con el método de Nissl e inmunohistoquímica para NeuN. Para evaluar el grado de pérdida neuronal en el hipocampo, se usaron secciones de hipocampo teñidos mediante el método de Nissl para estimar la densidad

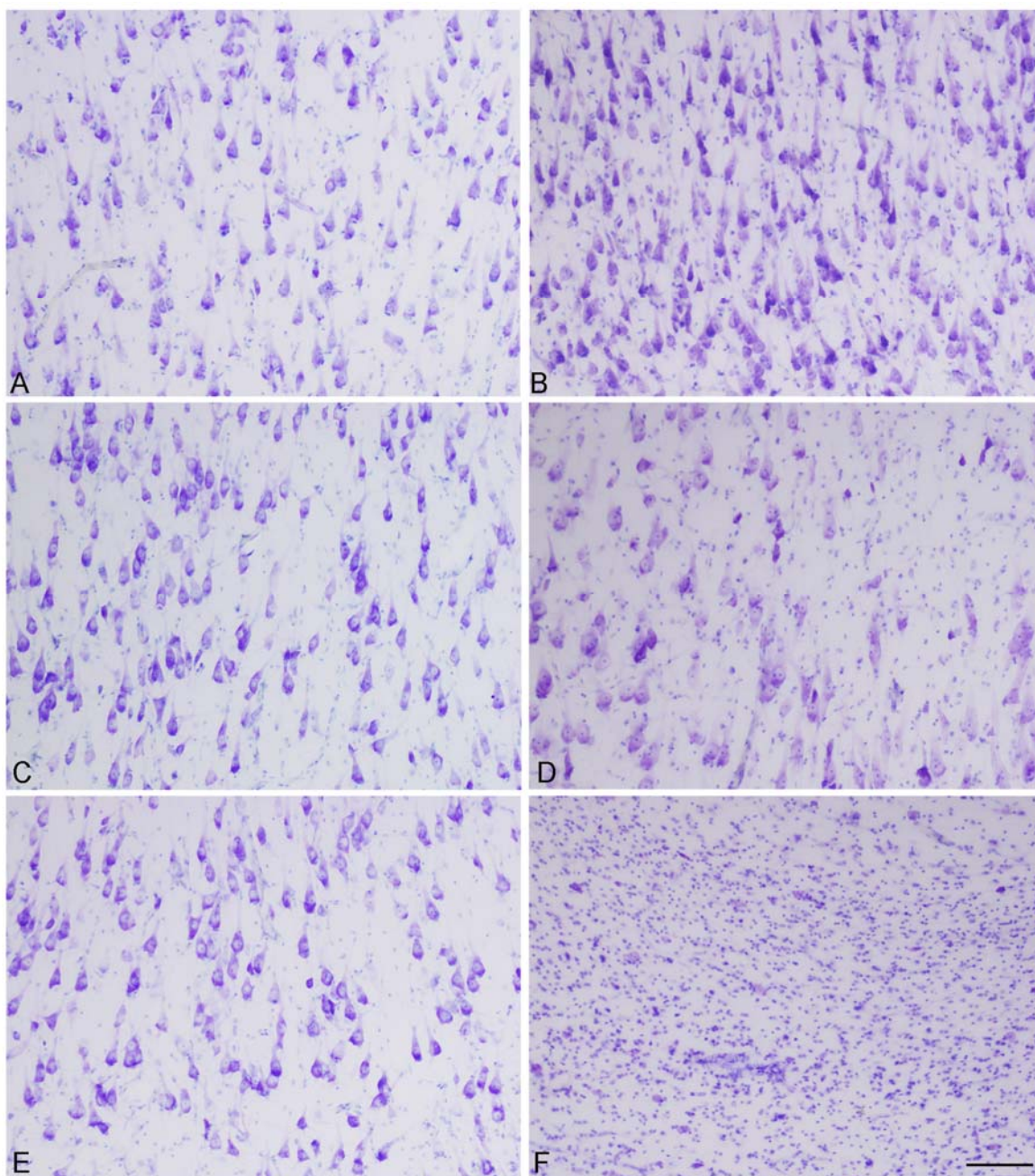


Fig. 31. Microfotografías a mayor aumento de las áreas del hipocampo estudiadas (Fig. 17) teñidas mediante el método de Nissl. **A, C, E:** Secciones del hipocampo no esclerótico para ilustrar el subículo (**A**), la región de transición subículo/CA1 (**C**) y CA1 (**E**). **B, D, F:** Secciones del hipocampo esclerótico para mostrar el subículo (**B**), la región de transición subículo/CA1 donde se aprecia el inicio de la pérdida neuronal (**D**), y CA1 donde se observa pérdida neuronal severa y gliosis (**F**). Barra de escala: 1000 μ m.

neuronal en todos los campos del hipocampo, tanto en hipocampos escleróticos, como en control, es según estudios anteriores (Arellano *et al.*, 2004; Andrioli *et al.*, 2007). Además, se estimó la dispersión de células granulares en GD y la proliferación de fibras musgosas, tal como fue publicado en un trabajo realizado en nuestro laboratorio

(Arellano *et al.*, 2004). Los hipocampos escleróticos mostraban una clara pérdida neuronal y gliosis (Figs. 17, 31). De esta manera, hemos clasificado los hipocampos como no escleróticos (n=3) y escleróticos (n=4). Para el estudio de la ultraestructura del neuropilo ha sido analizada la capa piramidal de las siguientes regiones (Figs. 17, 31):

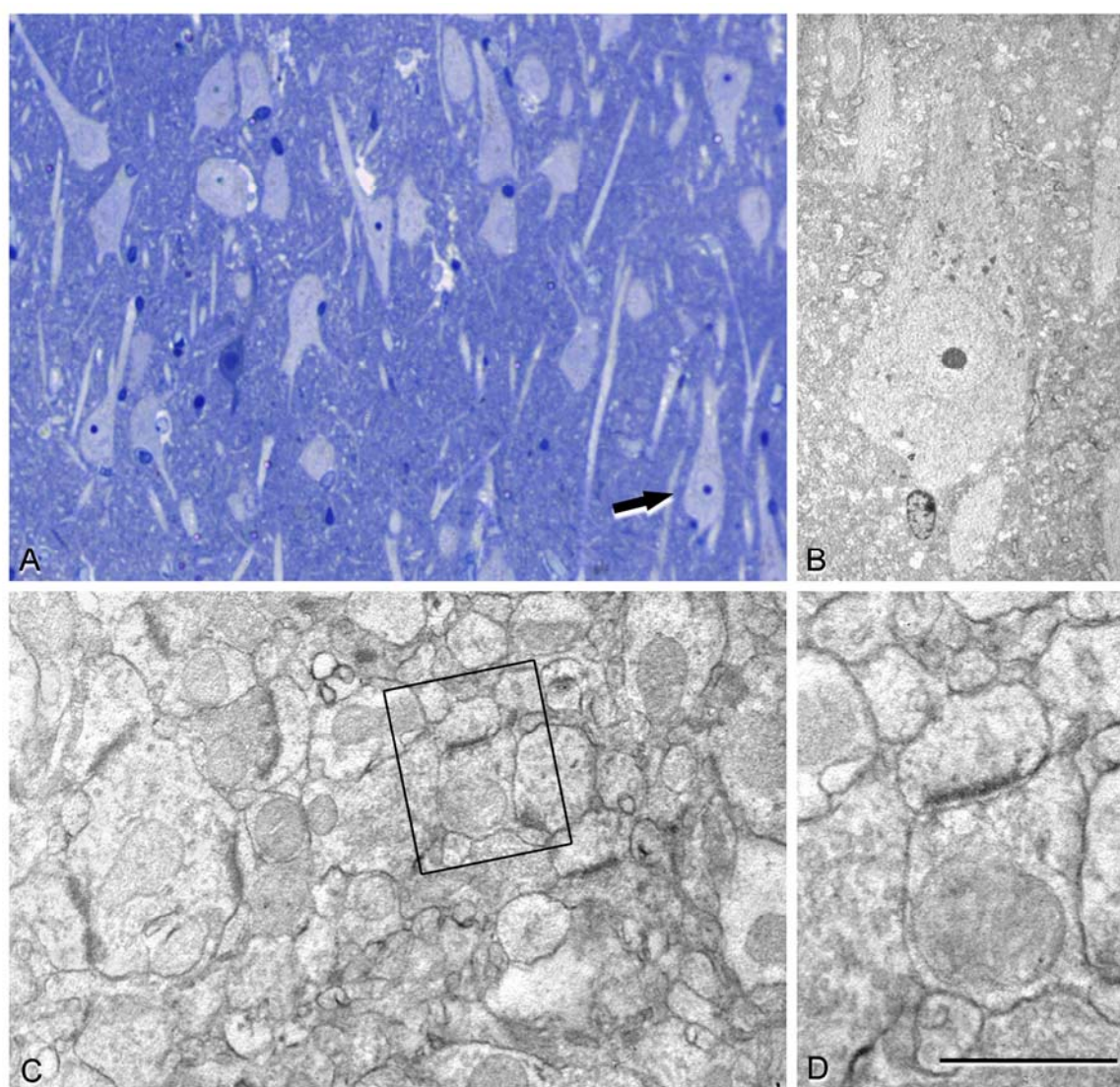
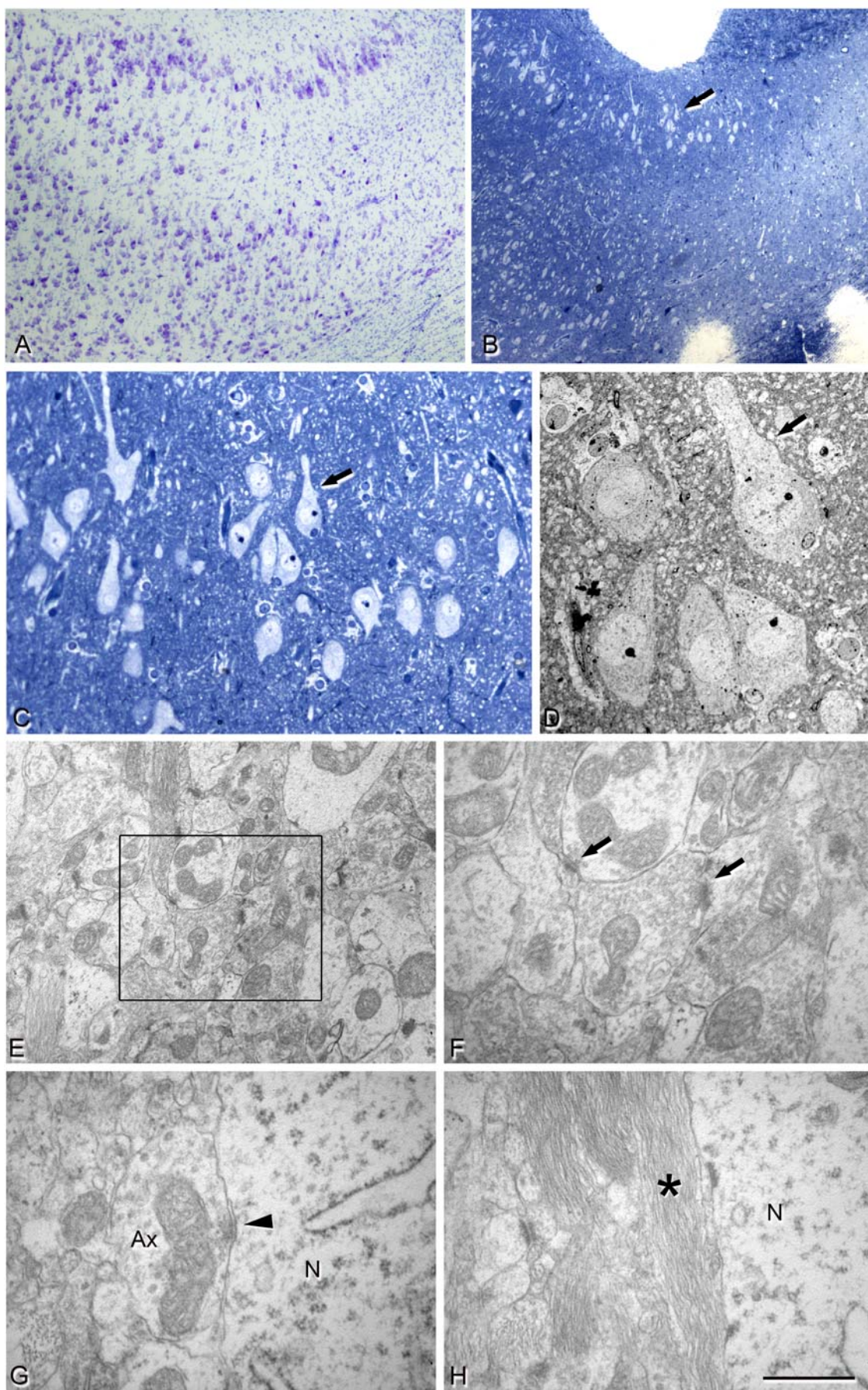


Fig. 32. Correlación de microscopía óptica y electrónica del subículo. **A:** Microfotografía de una sección semi-fina (2 μ m) teñida con azul de toluidina que muestra numerosas células piramidales. **B:** Fotografía obtenida con el microscopio electrónico que muestra la misma célula piramidal señalada en A. **C:** Fotografía que ilustra el neuropilo, con abundantes sinapsis. **D:** Mayor aumento del área recuadrada en C, en la que se observa una sinapsis asimétrica (excitadora) con una morfología típica (densidad postsináptica gruesa). Barra de escala: 120 μ m en A, 58 μ m en B, 1 μ m en C y 0,5 μ m en D.



Subículo: esta región se identificó en todos los casos, tanto en los escleróticos como en los no escleróticos. En ambos casos dicha región no presentaba alteraciones histológicas aparentes (Fig. 31 A, B).

Subículo/CA1: la región de transición entre subículo y CA1, sólo fue considerada en los casos escleróticos (Fig. 31 C, D). Se encontraron pocas neuronas aisladas, y numerosas células gliales.

CA1: en los casos no esclerótico no presentaba alteraciones histológicas (Fig. 31 E); mientras que en los escleróticos mostraba una pérdida neuronal severa y numerosas células gliales (Fig. 31 F).

Las regiones subículo y subículo/CA1 son especialmente importantes porque se corresponden con áreas en las que ha sido registrada actividad interictal, mediante estudios realizados en rodajas de corteza temporal procedente de pacientes con esclerosis de hipocampo (Cohen *et al.*, 2002).

4.2.2. Estudio de la ultraestructura y morfología de los contactos sinápticos

Para realizar el estudio ultraestructural por regiones se utilizó el método de correlación de microscopía óptica y electrónica

(DeFelipe y Fairén, 1993), que permite la identificación precisa en el microscopio electrónico de las regiones de interés, mediante la selección previa en el microscopio óptico (*vid.* apartado 3.6).

En el tejido estudiado se identificaron dos tipos de sinapsis corticales, según su morfología: sinapsis asimétricas (o de tipo I) y simétricas (o tipo II) (Gray, 1959a, b; Colonnier, 1968; *vid.* 1.2.4.).

La ultraestructura del neuropilo fue estudiada en las regiones descritas (*vid.* 4.2.1):

Subículo: la ultraestructura de esta región, tanto en los hipocampos no escleróticos, como en los escleróticos mostró características que coinciden con las descritas previamente en otros estudios de la corteza cerebral (revisado en Peters *et al.*, 1991), apreciándose numerosos somas de neuronas y glia, prolongaciones dendríticas y gliales, axones mielínicos y no mielínicos y numerosos contactos sinápticos (Fig. 32). Es decir, esta región presenta unas características “normales” en los dos tipos de tejido estudiado.

Subículo/CA1: el análisis de la ultraestructura en esta región, mostró un aumento gradual (hacia la región esclerótica) del número de prolongaciones gliales (Fig.33). En esta

← **Fig. 33.** Correlación de microscopía óptica y electrónica de la región subículo/CA1 de un hipocampo esclerótico. **A**: Sección de 50µm teñida mediante el método de Nissl en la que se observa la disminución gradual de células piramidales cerca de CA1. **B**: Microfotografía de una sección semifina (2 µm) teñida con azul de toluidina obtenida de una sección adyacente a A. **C**: Detalle del mismo grupo de células piramidales señaladas en B (flecha). **D**: Imagen obtenida con el microscopio electrónico del grupo de células señaladas en B y C (flecha), tomada de una sección ultrafina obtenida al reseccionar la sección semifina ilustrada en B y C. **E**: Microfotografía electrónica del neuropilo donde se observa numerosas sinapsis. **F**: Mayor aumento del recuadro en E donde se observan dos sinapsis (flechas). **G**: Microfotografía electrónica a mayor aumento para ilustrar la presencia de una sinapsis simétrica típica entre un axón (Ax) y el soma de una neurona (N). **H**: Microfotografía para ilustrar la presencia de prolongaciones gliales (asterisco) que rodean el soma de una neurona (N), lo que impide la formación de sinapsis perisomáticas. Barra de escala: 430 µm en A, 340 µm en B, 75 µm en C, 19 µm en D, 1,6 µm en E, 0,8µm en F, 0,7µm en G y 0,8µm en H.

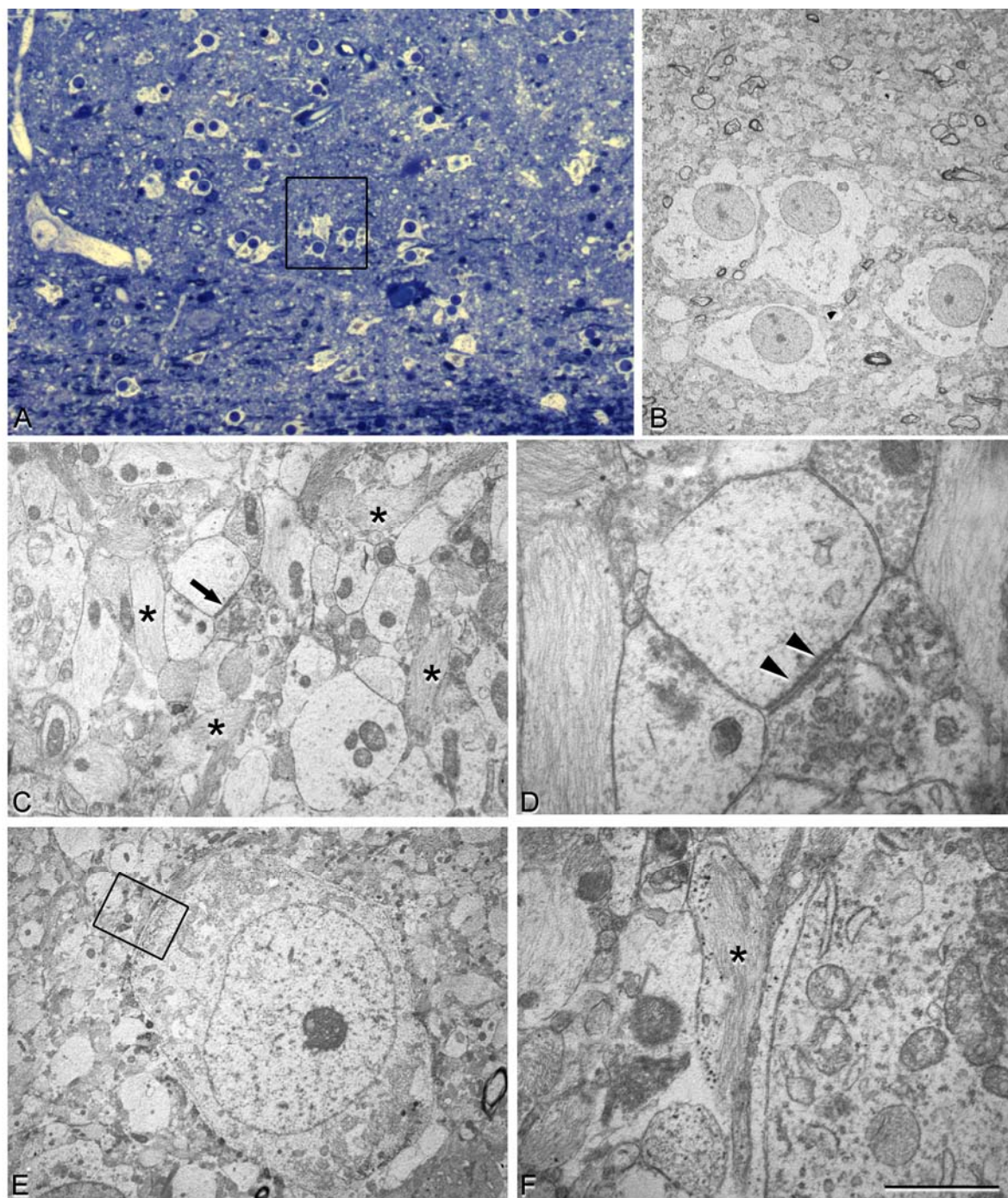


Fig. 34. Correlación de microscopía óptica y electrónica de la región CA1 de un hipocampo esclerótico. **A:** Microfotografía de una sección semifina (2 μ m) teñida mediante azul de toluidina, que muestra numerosos astrocitos y muy pocas neuronas. **B:** Fotografía obtenida mediante el microscopio electrónico a bajos aumentos tomada al reseccionar la sección semifinal. El recuadro en A muestra el mismo grupo de astrocitos. **C:** Microfotografía electrónica que ilustra el neuropilo con abundantes prolongaciones gliales (algunas de ellas indicadas con asteriscos) y una sinapsis (flecha). **D:** Mayor aumento de C para ilustrar una sinapsis asimétrica. Nótese que el elemento presináptico contiene orgánulos en degeneración y se distingue una prominente densidad post-sináptica (flecha). **E:** Microfotografía electrónica del soma de una neurona aislada y el neuropilo adyacente. **F:** Mayor aumento de la zona del recuadro en E para mostrar la presencia de las prolongaciones gliales (asterisco) alrededor del soma neuronal (N). Barra de escala: 70 μ m en A, 11 μ m en B, 2,8 μ m en C, 0,5 μ m en D, 5,6 μ m en E y 1 μ m en F.

región había neuronas dispersas, y algunas de ellas estaban densamente rodeadas por prolongaciones gliales (Fig. 33 H).

CA1 no esclerótico: la ultraestructura de esta región, mostró las características típicas que coinciden con las descritas previamente en otros estudios (Peters *et al.*, 1991), apreciándose somas de neuronas y glia, prolongaciones dendríticas y gliales, axones y numerosos contactos sinápticos.

CA1 esclerótico: se encontraron abundantes prolongaciones gliales, que ocupaban prácticamente todo el neuropilo (Fig. 34) y rodeaban densamente las escasas neuronas presentes (Fig. 34 E, F). Se apreció una fuerte disminución, o casi desaparición, de los contactos sinápticos. Además se encontraron especializaciones de membranas similares a sinapsis, de una longitud anormalmente larga, que no presentaban los elementos típicos que permitían identificarlas como sinapsis típicas (Fig. 35).

4.2.3. Longitud de los contactos sinápticos

En cada una de las regiones consideradas se realizó el estudio de la longitud de los contactos sinápticos. A pesar de que en CA1 esclerótico observamos algunas sinapsis anormalmente grandes, el análisis de la longitud sináptica no mostró diferencias significativas entre las regiones estudiadas en el tejido esclerótico, ni con las longitudes sinápticas del tejido no esclerótico.

Tampoco se encontraron diferencias significativas al analizar la longitud sináptica por cada tipo de sinapsis, ni entre las diferentes regiones estudiadas, ni entre los dos grupos de pacientes (sin y con esclerosis).

Sin embargo, se encontró una diferencia significativa ($P < 0,05$) al comparar las longitudes medias de las sinapsis simétricas ($0,20 \mu\text{m}$) y asimétricas ($0,30 \mu\text{m}$) de todas las regiones, siendo de menor tamaño las primeras, como se ha descrito en estudios previos en la corteza cerebral humana (Tabla 5;

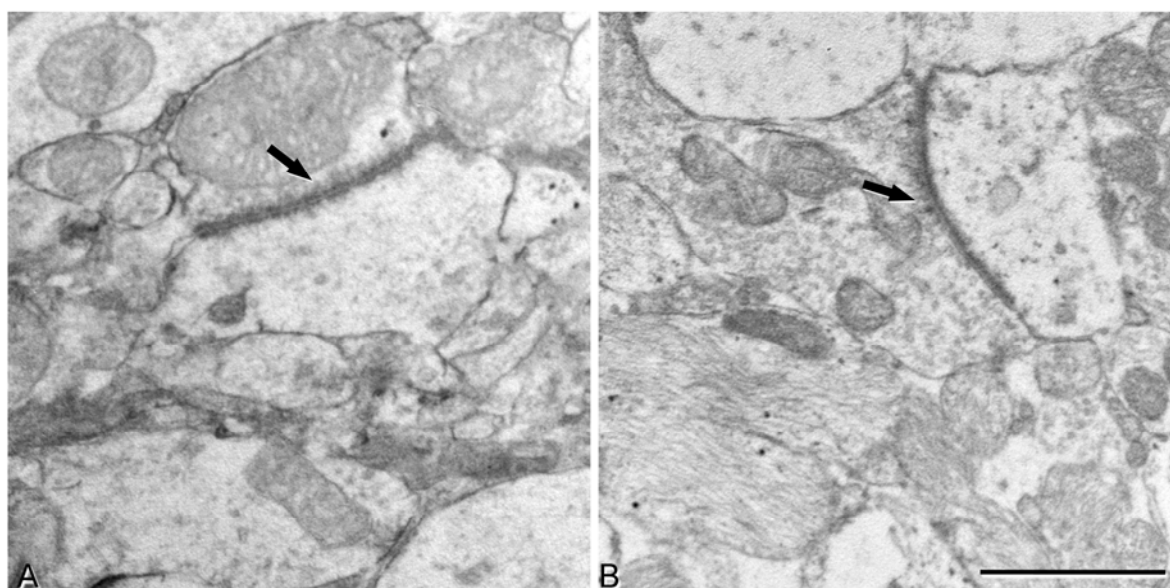


Fig. 35. Microfotografías electrónicas procedentes de la región CA1 esclerótico de un hipocampo humano, para ilustrar las especializaciones de membranas parecidas a sinapsis anormalmente largas (flechas en **A** y **B**). Barra de escala: $1 \mu\text{m}$.

revisado en DeFelipe *et al.*, 2002).

4.2.4. Determinación de la densidad sináptica

La morfología y la densidad de sinapsis fueron estudiadas en las regiones descritas anteriormente (Figs. 17, 31). Las sinapsis se cuantificaron en el neuropilo fino (excluyendo vasos, somas de células, dendritas grandes y axones mielinizados, DeFelipe *et al.*, 1999b). En total hemos estudiado una superficie de $6664 \mu\text{m}^2$ de neuropilo fino, y se han analizado un total de 1171 sinapsis.

En primer lugar se realizó un estudio comparativo de las densidades sinápticas entre los hipocampos no escleróticos y los escleróticos,

en el subículo y en CA1 (Figs. 31, 36A, Tabla 5).

El estudio de las densidades sinápticas en el subículo, considerando todos los tipos de sinapsis, no mostró diferencias entre los hipocampos no escleróticos y los escleróticos (Fig. 36, Tabla 6). Tampoco se encontraron diferencias significativas cuando las densidades fueron analizadas separadamente según el tipo de sinapsis.

Asimismo, se estimó la proporción de cada tipo de sinapsis en el subículo de ambos grupos. En los hipocampos no escleróticos se encontró que un 72% eran asimétricas y un 28% simétricas, mientras que, en esta misma región, los hipocampos escleróticos mostraron un 82% de sinapsis asimétricas y un

Tabla 5. Datos acumulados de todas las regiones estudiadas. Trans: región en transición entre CA1/subículo. Todas las sinapsis incluyen simétricas, asimétricas y no caracterizadas.

	No esclerótico		Esclerótico		
	Sub	CA1	Sub	Trans,	CA1
Longitud media de sinapsis asimétricas (promedio \pm SD, en μm)	0,30 \pm 0,04	0,27 \pm 0,03	0,26 \pm 0,02	0,28 \pm 0,03	0,39 \pm 0,30
Longitud media de sinapsis simétricas (promedio \pm SD, en μm)	0,16 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02	0,15 \pm 0,01	0,22 \pm 0,03	0,27 \pm 0,14
Longitud media de todos tipos de sinapsis (promedio \pm SD, en μm)	0,25 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02	0,23 \pm 0,01	0,27 \pm 0,03	0,34 \pm 0,23
Densidad de sinapsis asimétricas ($\times 10^8/\text{mm}^3$, promedio \pm SD)	3,92 \pm 0,87	5,99 \pm 1,56	6,69 \pm 2,77	5,08 \pm 0,92	0,32 \pm 0,28
Densidad de sinapsis simétricas ($\times 10^8/\text{mm}^3$, promedio \pm SD)	2,68 \pm 0,12	2,34 \pm 0,53	2,42 \pm 0,61	0,96 \pm 0,31	0,09 \pm 0,08
Densidad de todos tipos de sinapsis ($\times 10^8/\text{mm}^3$, promedio \pm SD)	10,99 \pm 1,68	13,53 \pm 3,61	13,74 \pm 2,07	9,32 \pm 0,67	0,81 \pm 0,57
Porcentaje de sinapsis asimétricas	72	83	82	86	84
Porcentaje de sinapsis simétricas	28	17	18	14	16

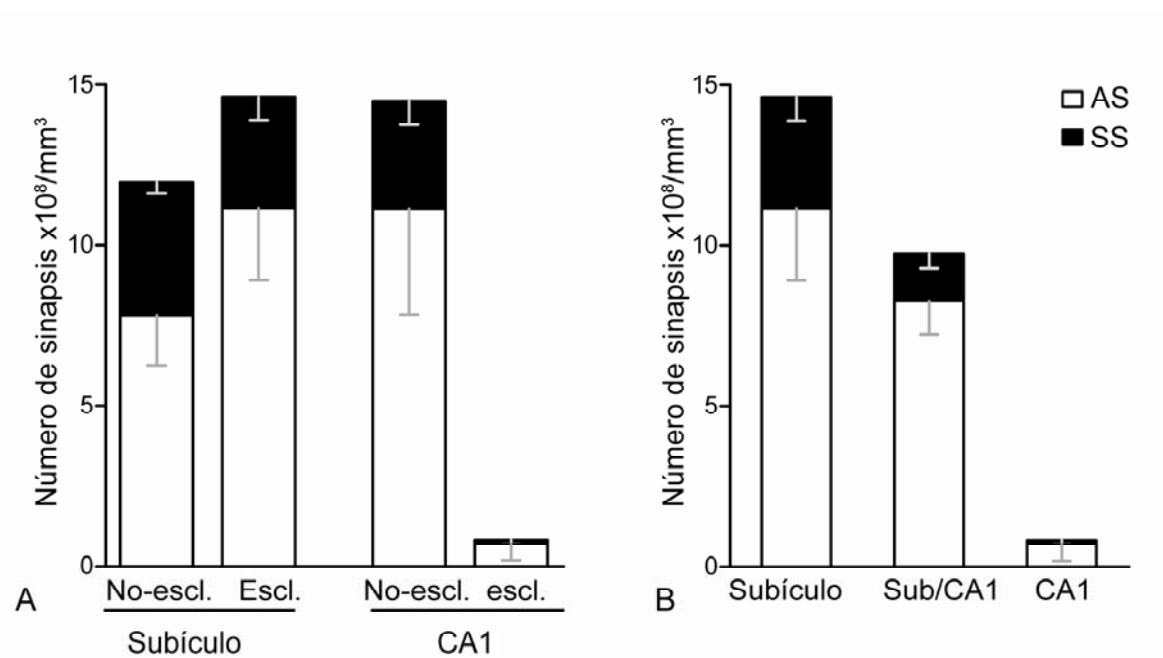
18% de sinapsis simétricas (Tabla 5). Es decir, el subículo de los hipocampos escleróticos presentaba una mayor proporción de sinapsis asimétricas, que los no escleróticos. La comparación de las densidades sinápticas en CA1, tanto considerando todos los tipos

de sinapsis como según el tipo de sinapsis, entre los hipocampos no escleróticos y los escleróticos, mostró valores significativamente menores en el tejido esclerótico (Fig. 36A, Tablas 5, 6).

A continuación, se realizó un estudio de las

Tabla 6. Comparación estadística de densidades sinápticas entre los diferentes campos del hipocampo. Trans.: región en transición entre CA1/subículo. AS: sinapsis asimétricas, SS: sinapsis simétricas, NC: sinapsis no caracterizadas. $P < 0,05$ *, $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***, n.s.: no significativo

	Sub no escler. vs escler.	CA1 no escler. vs escler.	Esclerótico		
			Sub vs Trans	Sub vs CA1	Trans. vs CA1
AS, SS, NC	n.s.	***	n.s.	***	***
AS	n.s.	***	n.s.	***	**
SS	n.s.	***	**	***	n.s.



densidades sinápticas por volumen en el tejido procedente de los hipocampos escleróticos, en cada una de las tres regiones consideradas (*vid.* apartado 4.2.1).

Este análisis mostró una disminución gradual de la densidad total, según el mayor grado de alteración histopatológica que presentaban las regiones estudiadas. Es decir, la región de subículo/CA1 tenía una densidad sináptica significativamente menor (un 32 % menos) que el subículo, y a su vez, el CA1 esclerótico mostraba valores significativamente menores que en el subículo/CA1 (91% de reducción). Asimismo, en el CA1 esclerótico se encontró una disminución altamente significativa de la densidad sináptica con respecto al subículo (reducción de un 94%).

En cuanto a la proporción de sinapsis asimétricas y simétricas en cada una de las regiones estudiadas en los hipocampos escleróticos, el subículo presentó un 82% de sinapsis asimétricas y un 18% de sinapsis simétricas (como ya se ha mencionado antes). En la región subículo/CA1 de los hipocampos escleróticos, un 86% de las sinapsis eran asi-

métricas y un 14% simétricas, mientras que en el CA1 esclerótico la proporción era de un 84% y 16%, respectivamente (Tabla 5).

Igualmente, se realizó el análisis de las densidades sinápticas por regiones en los hipocampos escleróticos teniendo en cuenta los tipos de sinapsis: asimétricas y simétricas (Fig. 36B). El estudio de las sinapsis asimétricas reveló una disminución gradual, que coincidía con la presencia de alteraciones histopatológicas (Tablas 5, 6). Esta disminución fue significativa al comparar el CA1 esclerótico con el subículo (un 94% de reducción) y CA1 esclerótico con la región subículo/CA1 (que mostró una reducción del 92%).

En el caso de las sinapsis simétricas, encontramos un patrón de significación similar a los anteriores (Tablas 5, 6). Al comparar subículo con la región subículo/CA1 y con el CA1 esclerótico, había disminuciones significativas de un 58% y un 96%, respectivamente. La comparación de la región subículo/CA1 con el CA1 esclerótico mostró una disminución significativa de un 91% (Fig. 36, Tabla 5).

4.3. ALTERACIONES DE LA CORTEZA TEMPORAL DE PACIENTES CON ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO

En el presente estudio se analizaron secciones procedentes de la corteza temporal de 23 pacientes con ELT y esclerosis del hipocampo confirmada (*vid.* apartado 3.1, tabla 2), con el fin de encontrar posibles alteraciones no detectables mediante la exploración habi-

tual (*vid.* apartado 3.1). Para ello las secciones se tiñeron mediante el método de Nissl, así como para los marcadores inmunocitoquímicos, NeuN y CLG-IV (*vid.* apartado 3.5). Este análisis histopatológico de las muestras reveló que sólo un 13% de los casos estudiados (n=3) no presentaban alteraciones en la corteza temporal lateral (Tabla 7). En el resto de los casos, un 87% (n=20)

Tabla 7. Alteraciones microscópicas encontradas en la corteza temporal de los pacientes con ELT y esclerosis de hipocampo. De los 23 casos analizados, 20 presentaron al menos una de las alteraciones descritas (87%). En la última línea de la tabla se expresa el porcentaje de los casos con respecto al total, que presentan las distintas alteraciones analizadas. * crisis febril.

Caso	Pérdida neuronal (Pe)	Alteraciones citoarquitectónicas (Ci)	Corpora amilacea (Am)	Alteraciones vasculares (Va)	Coexistencia de patologías	Grado según escala de Engel
H48	-	-	-	-	-	I
H57	x	x	-	-	Pe; Ci	I
H61*	-	x	-	x	Ci; Va	I
H67*	x	-	x	-	Ci; Am	I
H75	-	x	x	x	Am; Ci; Va	II
H84*	x	-	x	-	Pe; Am	I
H94*	-	x	-	-	-	II
H104*	x	x	x	-	Pe; Am; Ci	I
H108	-	x	x	x	Am; Ci; Va	III
H109	-	x	-	-	-	I
H115	-	-	-	-	-	III
H123*	x	-	-	-	-	I
H136*	-	-	-	-	-	I
H220	-	-	x	-	-	I
H225	-	-	x	-	-	I
H229	-	x	x	x	Am; Ci; Va	I
H230	-	x	-	x	Ci; Va	III
H231	x	-	-	-	-	I
H233*	x	-	x	x	Pe; Am; Va	III
H236	-	-	-	x	-	I
H237	x	-	-	x	Pe; Va	I
H238*	-	x	-	-	-	I
H241	x	-	-	-	-	I
n=23	n=9	n=10	n=9	n=8	n=11	I: n=17
87%	40%	43%	40%	35%	48%	II-III: n=6

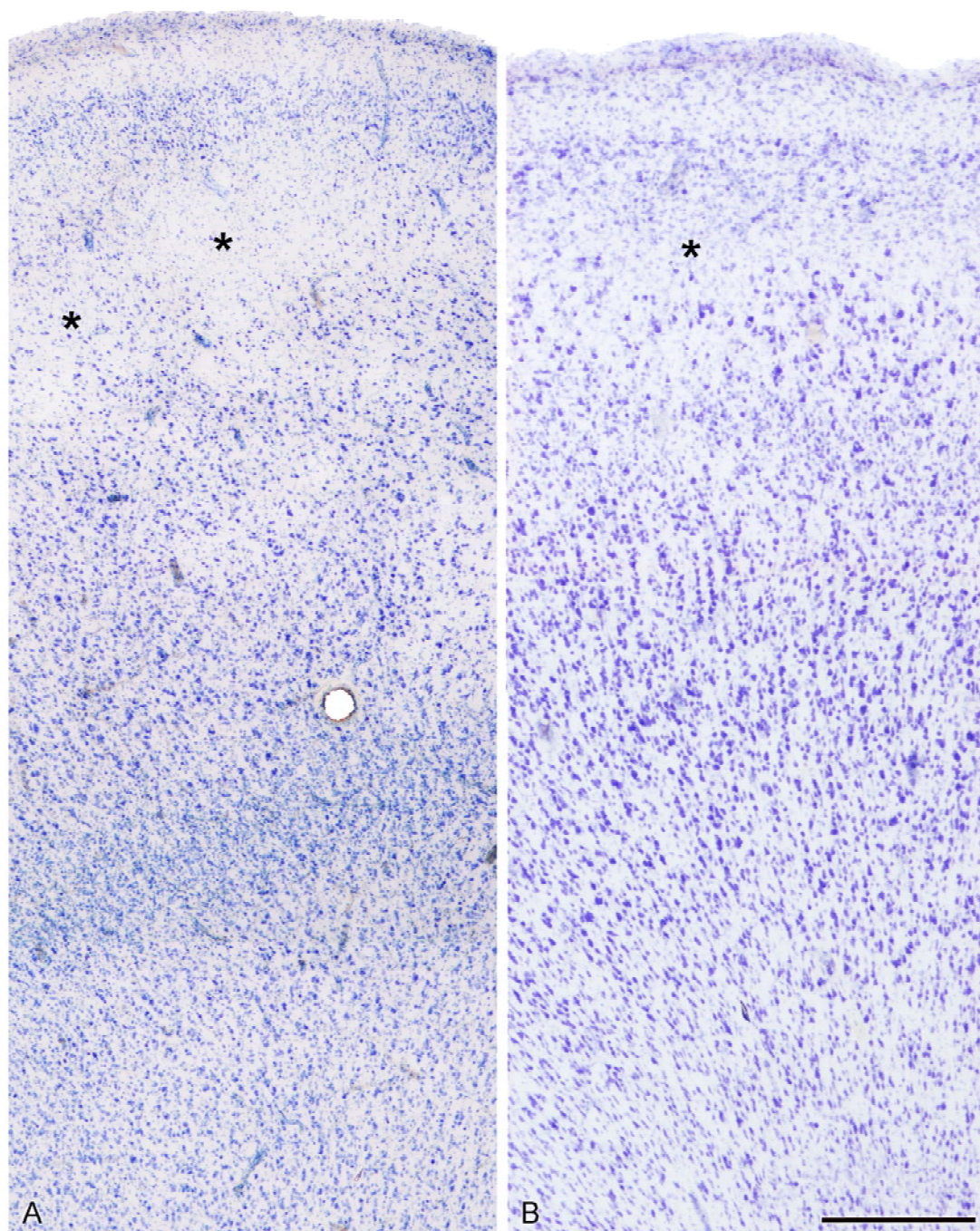
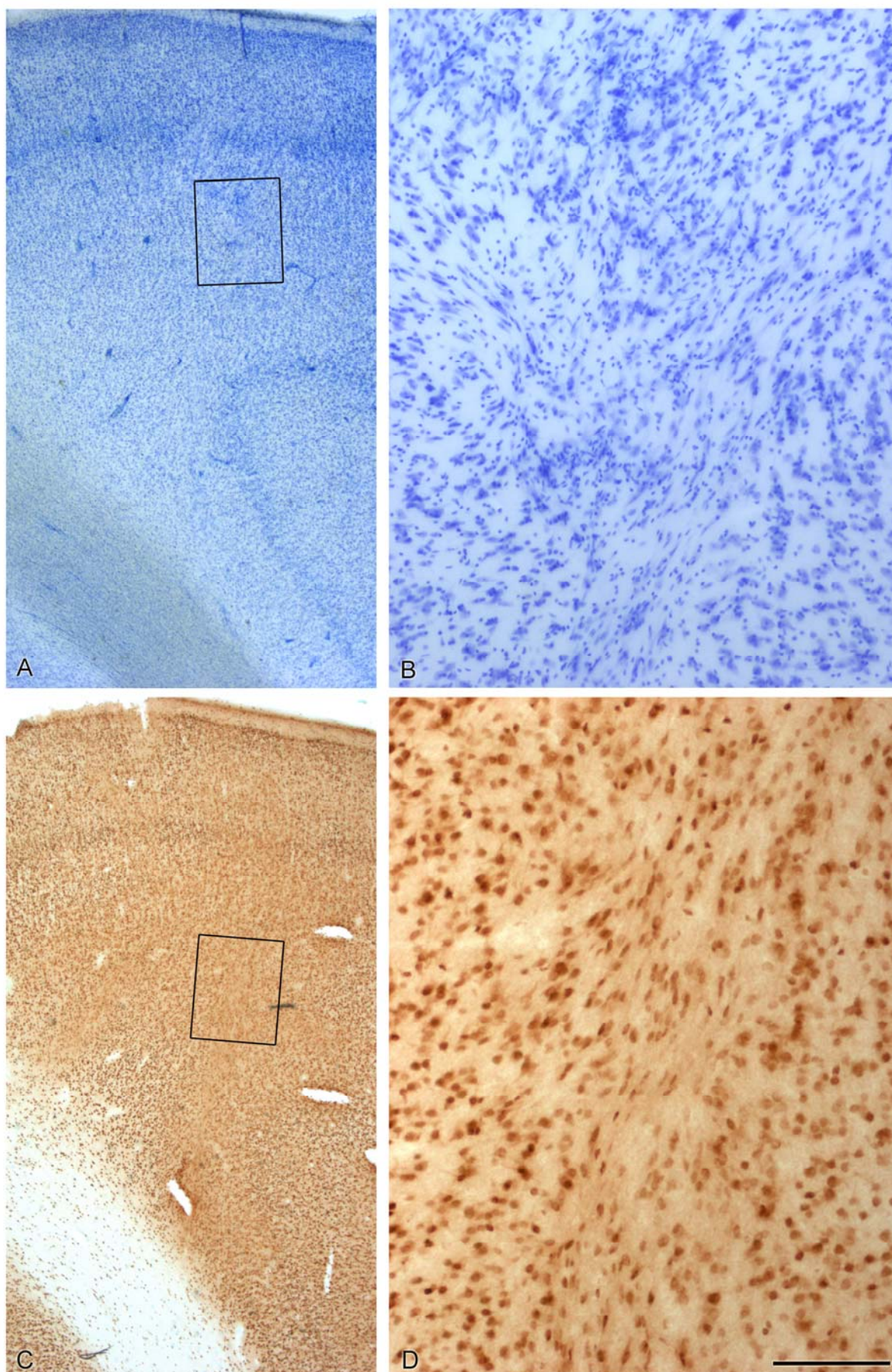


Fig. 37. A, B: Microfotografías de la corteza temporal procedente de dos pacientes epilépticos con esclerosis del hipocampo teñidas mediante el método de Nissl, en las que se muestra pérdida neuronal en las capas II y III (asteriscos). Barra de escala 400 μ m.

Fig. 38. Microfotografías que muestran alteraciones citoarquitectónicas encontradas en la corteza temporal procedente de un paciente con ELT con esclerosis del hipocampo para ilustrar la pérdida de laminación y orientación anómala de las neuronas en dos secciones adyacentes. **A, B:** Secciones teñidas mediante el método de Nissl, donde B es un mayor aumento del área recuadrada en A. **C, D:** Tinción inmunohistoquímica para NeuN, donde D es un detalle del área recuadrada en C. Barra de escala: 1000 μ m en A, C, 150 μ m en B, D. →



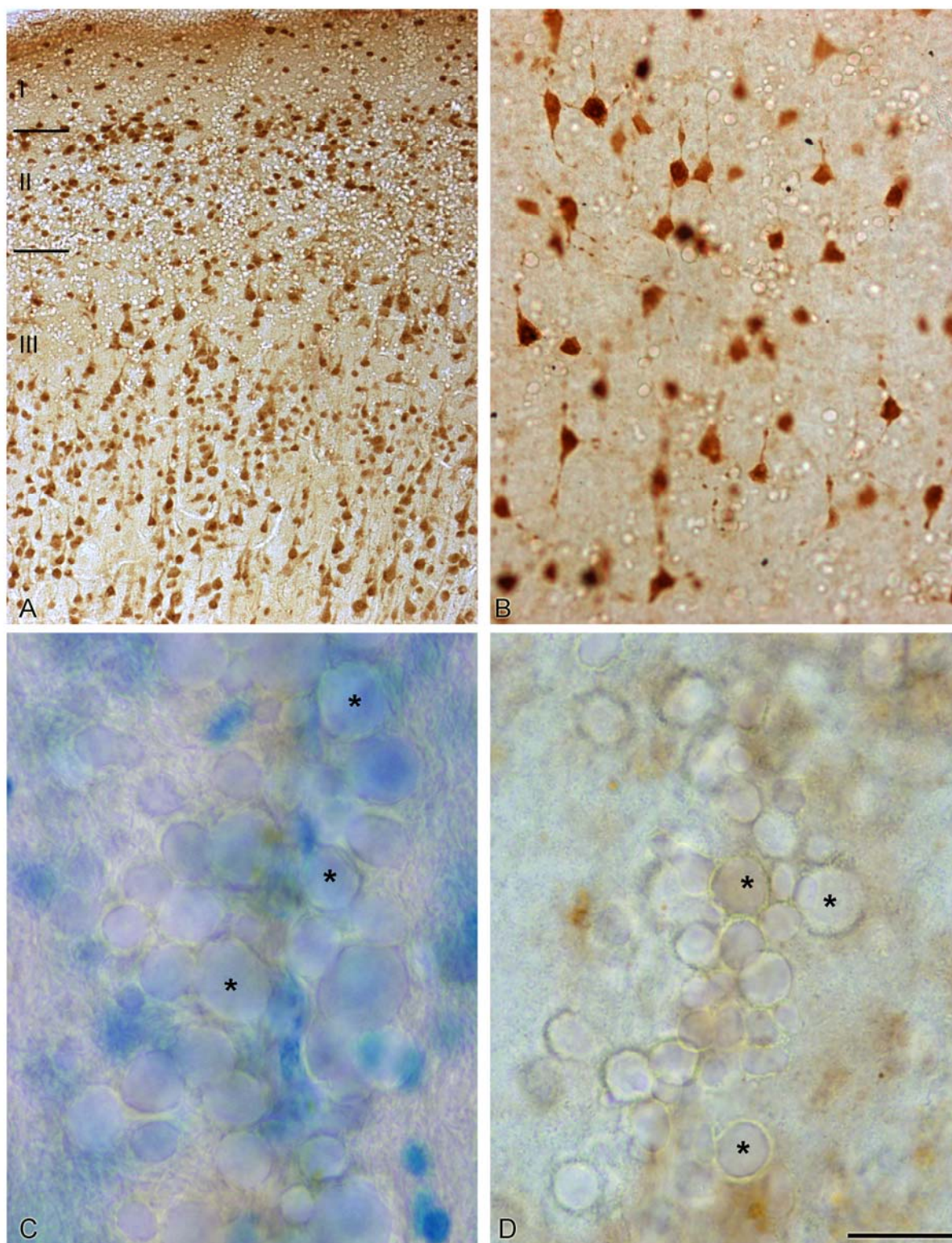


Fig. 39. A-B: Microfotografías de la corteza temporal procedente de pacientes epilépticos con esclerosis del hipocampo en secciones marcadas para NeuN. En **A**, se observa una pérdida neuronal y abundantes *corpora amilacea* en capas I-III. En **B**, se ilustran abundantes *corpora amilacea* en la capa VI. **C, D:** Imágenes obtenidas en la sustancia blanca para ilustrar la apariencia de los *corpora amilacea* (asteriscos) en una sección teñida con el método de Nissl (**C**) y con inmunohistoquímica para NeuN (**D**). La visualización de los *corpora amilacea* no se debe a ningún marcaje específico, sino al contraste obtenido con el condensador del microscopio óptico. Barra de escala: 150 μ m en A, 75 μ m en B, 15 μ m en C y D.

se encontraron diversos tipos de alteraciones histopatológicas microscópicas como pérdida neuronal focal (Fig. 37), alteraciones citoarquitectónicas (Fig. 38), exceso de *corpora amilacea* (Fig. 39) y alteraciones vasculares (Figs. 40-42) que se detallaran a continuación.

4.3.1. Pérdida neuronal

En el presente estudio se ha encontrado pérdida neuronal focal en la corteza temporal en 9 casos, lo que constituía un 45% de las alteraciones microscópicas encontradas (Fig. 37; Tabla 7). La pérdida neuronal pue-

de ser irregular y poco marcada, extendida horizontalmente en una capa (pérdida laminar) o verticalmente, en varias capas (pérdida columnar) (Meldrum y Bruton, 1992; Du *et al.*, 1993; Yilmazer-Hanke *et al.*, 2000; Thom *et al.*, 2000; Thom *et al.*, 2005). La pérdida neuronal encontrada en el presente estudio era de varios tipos: pérdida laminar que afectaba la capa II (2 casos), pérdida laminar en capa III (2 casos), pérdida laminar en capa II y pérdida columnar en capas II-VI (1 caso), pérdida neuronal disseminada en capa II-III (3 casos) y pérdida neuronal disseminada en capa II-IV (1 caso).

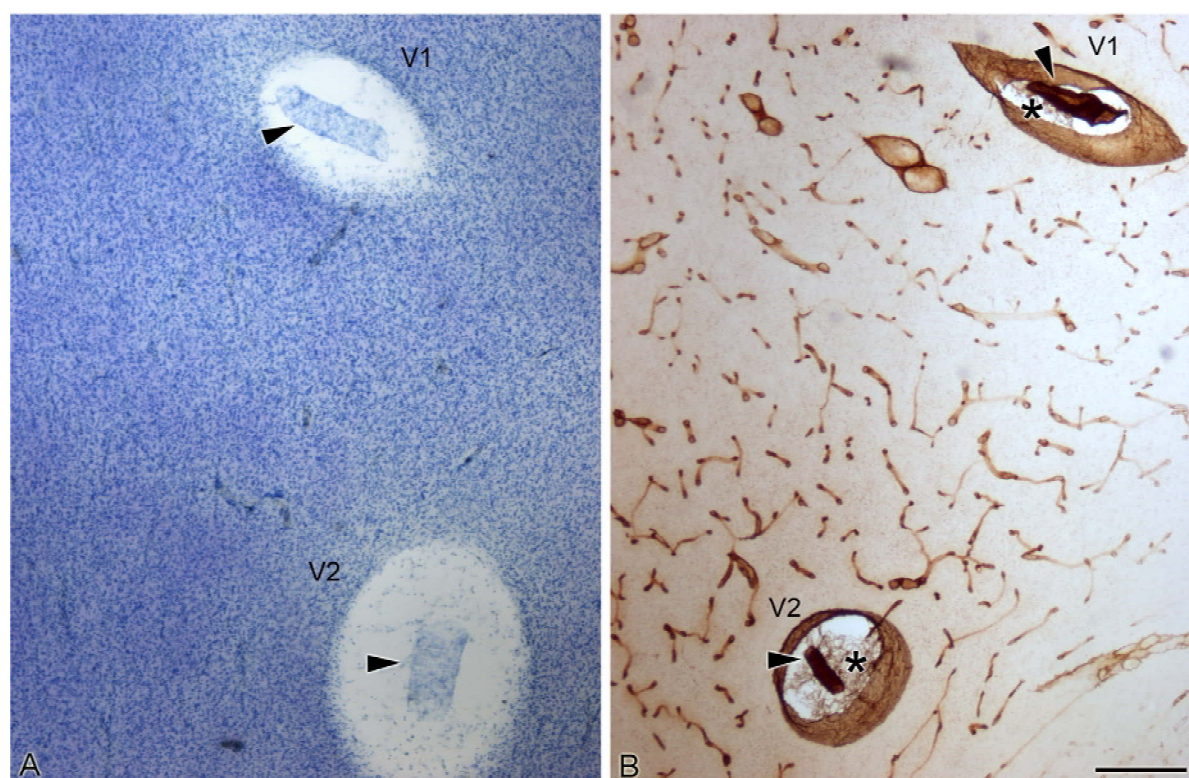


Fig. 40. Microfotografías de la sustancia blanca de dos secciones adyacentes de la corteza temporal lateral procedente de un paciente epiléptico con esclerosis de hipocampo, teñidas mediante el método de Nissl (A) e inmunohistoquímica para CLG-IV (B). **A:** Microfotografía para ilustrar vasos de gran calibre (V1 y V2). **B:** Marcaje para CLG-IV en la que se observa que los vasos V1 y V2 son estructuras similares a vasos de gran tamaño, aparentemente sin células en su interior, que presentan en el medio una estructura tubular fina positiva para CLG-IV (punta de flecha), rodeada por unas fibras también positivas para CLG-IV formando una malla (asterisco) en el espacio perivascular. Barra de escala: 250 μ m.

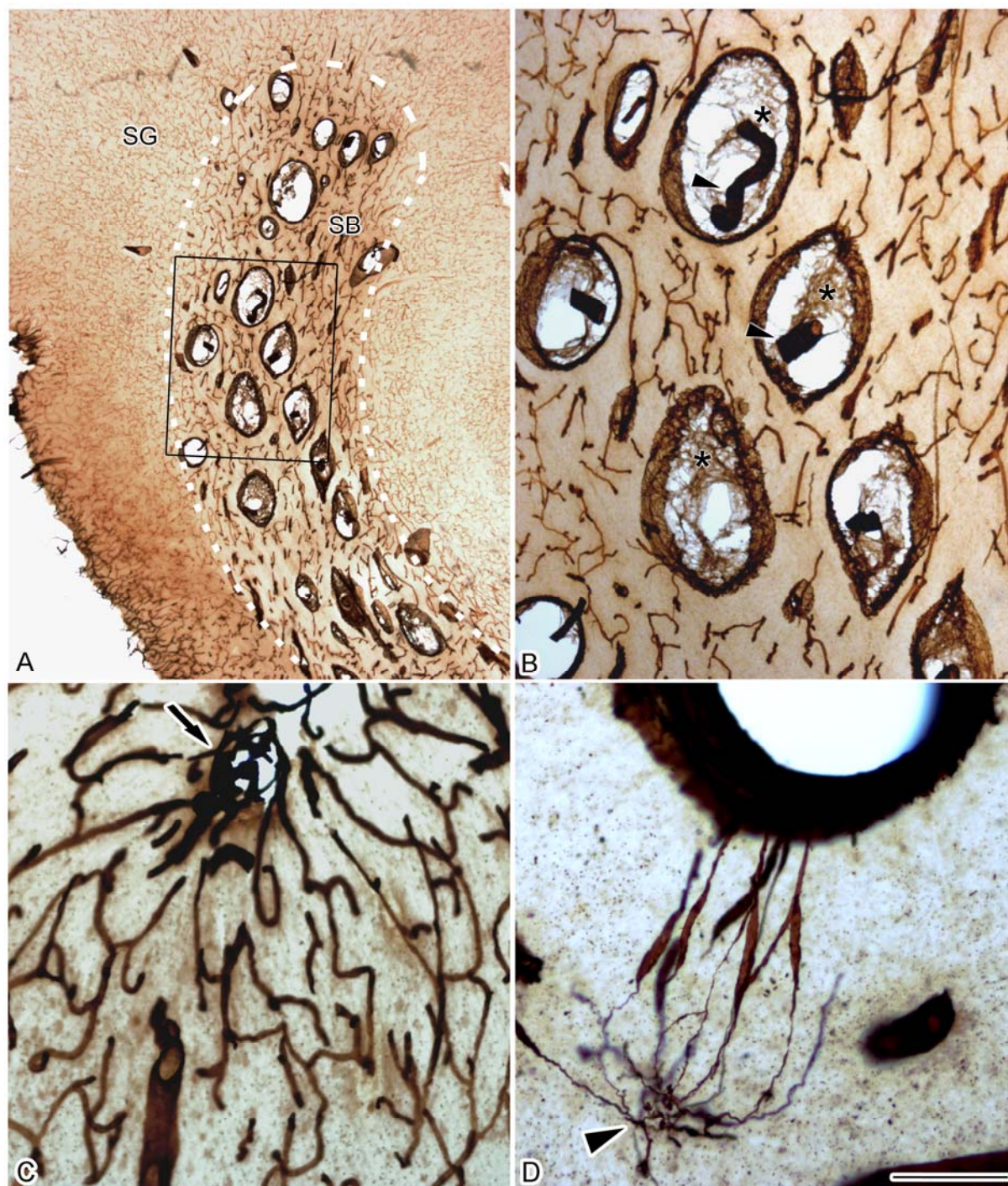


Fig. 41. Microfotografías de secciones marcadas para CLG-IV, procedentes de biopsias de pacientes epilépticos con esclerosis del hipocampo para ilustrar la presencia de diferentes alteraciones vasculares. **A:** Corteza temporal donde se observan numerosos vasos con morfología alterada localizados exclusivamente en la sustancia blanca (SB, delimitada por una línea blanca discontinua). **B:** Detalle del área recuadrada en A, para ilustrar las alteraciones de los vasos. Se observan estructuras similares a vasos de gran tamaño, que presentan en el medio una estructura tubular fina positiva para CLG-IV (punta de flecha), rodeada por fibras positivas para CLG-IV (asterisco). **C:** Red de capilares aislada y compacta en la sustancia gris (flecha). **D:** Agrupación de estructuras finas, positivas para CLG-IV, unidas a un vaso dilatado (punta de flecha). SG: sustancia gris. Barra de escala: 1200 μm en A, 375 μm en B, 75 μm en C y D.

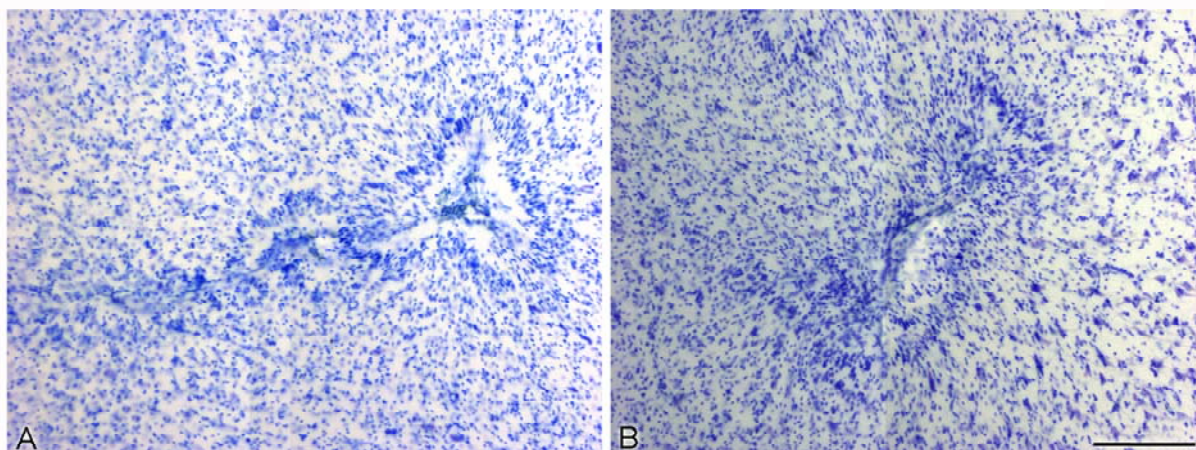


Fig. 42. Microfotografías para ilustrar alteraciones vasculares con infiltración perivascular en la sustancia blanca de secciones de la corteza temporal lateral, procedente de un paciente epiléptico con esclerosis de hipocampo, teñidas mediante el método de Nissl. Se observa una intensa gliosis alrededor de los vasos alterados. Barra de escala: 150 μ m.

4.3.2. Alteraciones citoarquitectónicas

En el presente estudio, un 50% (n=10 casos) presentaban alteraciones citoarquitectónicas, que incluían afectación de la organización laminar y columnar de la corteza, neuronas orientadas de manera anómala y agrupaciones dispersas (Fig. 38; Tabla 7). Estas alteraciones histopatológicas eran parecidas a algunos tipos de desarrollo anormal cortical descritas en pacientes con epilepsia de lóbulo temporal con esclerosis de hipocampo (Thom *et al.*, 2000; Thom *et al.*, 2005; revisado en Rickert, 2006).

4.3.3. Presencia de *corpora amilacea*

Los *corpora amilacea* son unos cuerpos esféricos intracitoplásmicos de un diámetro medio de 15 μ m, que se forman en las prolongaciones de los astrocitos fibrosos y que contienen una sustancia similar al glucógeno, polímero de glucosa. En condiciones normales los *corpora amilacea* se encuentran en la sustancia gris, cerca de la pía (capa I), o en la sustancia blanca, alrededor de los vasos, y son especialmente numero-

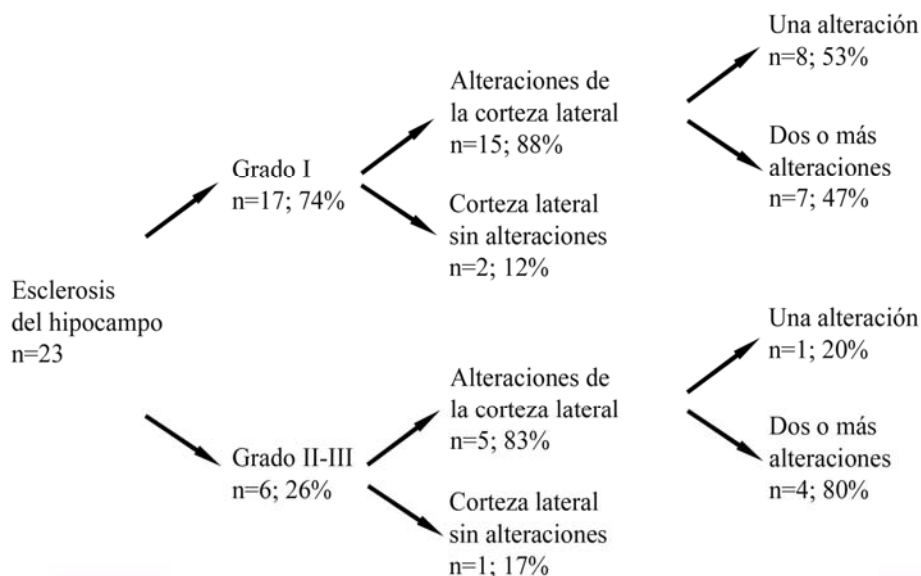
sos en condiciones degenerativas (Duchen, 1992, Nishio *et al.*, 2001).

En el presente estudio hemos encontrado abundante *corpora amilacea* en la sustancia blanca y/o en la capa I de 9 casos (45% de los casos). Además, en algunos casos que presentaban pérdida neuronal focal en la corteza temporal, las áreas afectadas presentaban escasas células piramidales y un exceso de *corpora amilacea* (Fig. 39; Tabla 7).

4.3.4. Alteraciones vasculares

El estudio de la corteza lateral ha revelado alteraciones vasculares en 8 casos (40 %). Una de las alteraciones vasculares más frecuentes fue el ensanchamiento del espacio perivascular en sustancia blanca (Nishio *et al.*, 2000; Hildebrandt *et al.*, 2008). En el presente trabajo un 35% de los casos presentaron esta alteración vascular (Fig. 40; Tabla 7). En estos casos, la inmunohistoquímica para el CLG-IV mostró estructuras similares a vasos de gran tamaño, que presentaban una estructura tubular fina positiva para el CLG-IV en el centro, rodeada por unas fi-

Tabla 8. Resultados de la cirugía y alteraciones encontradas en la corteza temporal.



bras, también positivas para CLG-IV, que formaban un fino entramado (Figs. 40; 41 A, B). Además, en un caso se observó una agrupación aislada de estructuras finas, positivas para el CLG-IV, unida a un capilar (Fig. 41, D). Dos de ellos además tenían infiltración perivascular (Fig.42).

Finalmente, en un caso que no presentaba ensanchamiento de espacio perivascular hemos encontrado una red capilar compacta (Fig. 41, C).

4.3.5. Relación entre las alteraciones microscópicas y evaluación postquirúrgica

La mayoría de los pacientes epilépticos operados mostraron una mejora considerable, siendo, su evaluación post-quirúrgica de grado I (Engel) en un 74%, mientras sólo un 17 % tenía resultados no tan favorables, con grado II o III (Engel). El número de casos

donde había alteraciones fue muy parecido entre los dos tipos de pacientes, tanto los que tenían grado I (88% de los casos), como los que tenían grado II o III (83% de los casos). Es decir no hemos encontrado una correlación clara entre el resultado quirúrgico de los pacientes operados y la presencia de las alteraciones descritas. En los casos que tenían resultado de cirugía favorable (grado I de Engel) hemos encontrado alteraciones en la corteza lateral en 15 de los 17 casos.

En estos 15 casos las alteraciones encontradas fueron las siguientes: pérdida neuronal (89%), exceso de *corpora amilacea* (67%), alteraciones citoarquitectónicas (60%) y alteraciones vasculares (50%). Un 53% presentaba sólo una de las alteraciones descritas, y en un 47% diversas alteraciones coexistían (Tablas 7, 8).

En los 6 casos, cuyo resultado quirúrgico

fue poco favorable (grado II y III), hemos encontrado alteraciones en la corteza lateral en 5 casos, estas alteraciones fueron las siguientes: pérdida neuronal (11%), exceso de *corpora amilacea* (33%), alteraciones ci-

toarquitectónicas (40%) y alteraciones vasculares (50%). Un 20% de estos presentaba sólo una de las alteraciones estudiadas, mientras que un 80% mostró la coexistencia de dos o más alteraciones (Tablas 7, 8).

DISCUSIÓN

En la presente tesis doctoral, hemos encontrado una serie de alteraciones microanatómicas en la formación del hipocampo de pacientes con ELT y esclerosis, que afectan a la vascularización y a la densidad sináptica del hipocampo esclerótico. Asimismo, la corteza temporal lateral aparentemente normal de pacientes con esclerosis del hipocampo también presenta alteraciones microanatómicas. A continuación se discutirán cada uno de los siguientes apartados:

-Alteraciones de la vascularización del hipocampo de pacientes con ELT;

-Alteraciones de los circuitos sinápticos en el hipocampo de pacientes con ELT;

-Histopatología de la corteza temporal de pacientes con ELT y esclerosis del hipocampo.

5.1. ALTERACIONES DE LA VASCULARIZACIÓN DEL HIPOCAMPO DE PACIENTES CON ELT

El principal hallazgo del presente estudio es una notable disminución de vasos sanguíneos (más del 70%) en la región CA1 de todos los hipocampos escleróticos procedentes de pacientes con ELT, así como de alteraciones morfológicas en los vasos remanentes. Conjuntamente, estos resultados indican una clara relación entre la esclerosis del hipocampo y la presencia de alteraciones vasculares en CA1.

El marcaje de AP en CA1 del hipocampo esclerótico de pacientes epilépticos disminuyó notablemente, mientras que en GD, CA2, CA3 y subículo no se encontraron diferencias significativas, pese a que algunos pacientes mostraron una disminución de vasos AP positivos. Es decir, la disminución fue

consistente en CA1 pero no en otras regiones del hipocampo. Además, se observó un marcaje homogéneo para AP en todos los campos del hipocampo procedente de pacientes epilépticos sin esclerosis, lo que sugiere que los cambios en la actividad de AP están relacionados específicamente con la esclerosis del hipocampo y no con la actividad epiléptica *per se*.

A pesar de que se desconoce la relevancia biológica de esta observación, en modelos animales de epilepsia se ha descrito que la actividad de la AP en el cerebro de rata varía tras la inducción de crisis epilépticas (Erakovic *et al.*, 2001). Además, la existencia de defectos genéticos en la expresión de la AP puede dar lugar a crisis epilépticas debidas a la alteración de su actividad normal (Whyte *et al.*, 1988; Waymire *et al.*, 1995; Narisawa *et al.*, 1997; Narisawa *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2002). Asimismo, se ha propuesto que la AP está involucrada en la regulación de la neurotransmisión y la síntesis de GABA en la corteza cerebral (Calhau *et al.*, 1999; Fonta *et al.*, 2004).

Por lo tanto, la deficiencia del marcaje de AP indica una modificación de su actividad, que puede implicar una alteración en la modulación del sistema GABAérgico. Dado que la hipótesis más aceptada para explicar el desarrollo de la epilepsia se fundamenta en la presencia de alteraciones en el sistema GABAérgico (revisado en Avoli, 1983; Prince *et al.*, 1997; DeFelipe, 1999), los cambios en la actividad de la AP pueden contribuir a la afectación del sistema GABAérgico en el hipocampo esclerótico.

Un aspecto muy interesante fue que la disminución en la densidad de vasos marcados

con AP en CA1, contrasta con la mayor densidad de los elementos marcados con colágeno-IV en los hipocampos escleróticos comparados con los no escleróticos. Este aparente incremento podría sugerir que ocurren procesos de angiogénesis, lo que coincide con el incremento en la densidad de vasos descrito en pacientes con ELT, mediante inmunohistoquímica para el factor vascular de crecimiento endotelial y los receptores de tirosin-kinasa (Rigau *et al.*, 2007). Así, la disminución de vasos observados en secciones teñidas por AP podría representar una alteración histoquímica en vez de una pérdida real de vasos. Por estos motivos el análisis ultraestructural fue fundamental para observar que los elementos marcados con colágeno-IV localizados en CA1 esclerótico, eran en su mayor parte capilares atróficos con un lumen prácticamente inexistente, y en su mayoría estaban ocupados por prolongaciones de astrocitos reactivos. Estas características indicaban que en esta región sucede un colapso importante de los vasos sanguíneos. De hecho, en CA1 se observaron muy pocos capilares normales. Estos hallazgos fueron posteriormente confirmados al estudiar la fracción de volumen ocupada por los vasos (V_v) en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, lo que permitió analizar de forma directa la presencia de vasos, ya que su visualización no depende de la actividad enzimática, ni de los niveles de proteína detectada con técnicas inmunohistoquímicas. En estos cortes semifinos encontramos una disminución de un 60% de la V_v ocupada por vasos sanguíneos en CA1. Esta disminución coincide con el descenso en el marcaje con AP, y demuestra

una pérdida real de la vascularización.

Por lo tanto, los cambios en la arquitectura vascular de CA1 observados en el presente trabajo, indican graves alteraciones del funcionamiento normal de los vasos sanguíneos.

5.1.1. Relación entre pérdida neuronal y vasos sanguíneos

En un estudio previo realizado en el mismo tejido, se observó una disminución significativa en la densidad total de neuronas en todas las regiones de los hipocampos escleróticos al compararlas con el tejido no esclerótico (Andrioli *et al.*, 2007). Puesto que la diferencia en la densidad de vasos era significativa solamente en CA1, nuestros resultados indican que no hay correlación entre las alteraciones de la actividad de AP y la pérdida neuronal y gliosis, en otras regiones que no sean CA1. Como ya se ha mencionado antes, en CA1 y en la región de transición entre CA1 y subículo, el marcaje inmunohistoquímico para colágeno-IV reveló la presencia de vasos con morfología alterada. Estos vasos alterados fueron encontrados principalmente en áreas donde la pérdida neuronal fue tan severa que virtualmente no había neuronas.

Se ha descrito que neuronas, células gliales y vasos sanguíneos presentan una asociación anatómica y funcional (revisado en Iadecola, 2004; Iadecola y Nedergaard, 2007; Drake y Iadecola, 2007), y esta asociación se considera una entidad funcional que se ha llamado “unidad neurovascular” (Lo *et al.*, 2003). Las alteraciones en la integridad de la unidad neurovascular se han asociado a procesos lesivos (Lo *et al.*, 2003). Si se inte-

rumpe la permeabilidad normal de la barrera hematoencefálica, se inicia un proceso inflamatorio (Ravizza *et al.*, 2008) y los factores liberados en dicho proceso dañan el tejido cerebral adyacente produciendo alteraciones en el balance iónico e induciendo la muerte celular (Lo *et al.*, 2003). Ya que la pérdida neuronal sucede en todos los campos armónicos y en el giro dentado del hipocampo esclerótico, su relación con las alteraciones vasculares no está clara. Sin embargo, la pérdida neuronal en CA1 es más severa que en el resto de los campos amónicos, sobre todo en la parte medial de CA1, donde la disminución puede llegar a ser de un 80% (Andrioli *et al.*, 2007). Así, es posible que un daño específico de la unidad neurovascular en CA1 cause la pérdida neuronal en esta región del hipocampo, y después los vasos adyacentes puedan degenerar convirtiéndose en elementos atróficos y no funcionales, tal y como hemos encontrado en CA1 y la región adyacente subículo/CA1.

No obstante, no podemos determinar si las alteraciones del sistema vascular preceden al daño neuronal en el hipocampo esclerótico, como se ha descrito en pacientes con leucoaraisis (Brown *et al.*, 2007), que es una enfermedad degenerativa que afecta a la sustancia blanca donde se observa una pérdida de vasos sin que haya ninguna lesión en la corteza cerebral. Así, la pérdida local masiva de vasos sanguíneos que se observa en CA1, puede hacer a esta región más susceptible al daño neuronal que otros campos del hipocampo.

Por otra parte, en el subículo y en el área de transición hacia CA1 se inician principalmente las descargas de tipo interictal

(Cohen *et al.*, 2002). Se ha propuesto que el subículo histológicamente normal de los hipocampos escleróticos, puede actuar como un área hiperexcitable que podría amplificar las salidas excitadoras procedentes de los campos amónicos del hipocampo esclerótico (Babb y Brown, 1986; Siegel *et al.*, 1990; Wieser *et al.*, 1993; DeFelipe, 1999). El subículo representa una zona de transición entre los campos CA y la corteza entorrinal, y es la principal estructura de salida del hipocampo (Finch y Babb, 1981; Witter *et al.*, 1989). Esta región de transición en los hipocampos escleróticos de pacientes con ELT presenta numerosas alteraciones. Por ejemplo, existen algunas neuronas piramidales sin innervación perisomática, mientras que otras presentan una hiperinnervación por terminales axónicos anormalmente densos procedentes de interneuronas (Arellano *et al.*, 2004). También, se han descrito cambios en la densidad y proporción de interneuronas PV-positivas en esta misma región (Andrioli *et al.*, 2007). Igualmente, esta región muestra alteraciones en la expresión y proporción de los cotransportadores NKCC / KCCC (Muñoz *et al.*, 2007).

Se ha propuesto que la coexistencia de estos cambios en el subículo y en la región de transición subículo/CA1, puede constituir el sustrato anatómico para las respuestas despolarizantes inducidas por señales GABAérgicas a través de receptores GABA_A (Cohen *et al.*, 2002). Por lo tanto, nuestros datos acerca de los cambios morfológicos de la vascularización en la región de transición CA1/ subículo acentúa la importancia de esta región en la epileptogenicidad del hipocampo esclerótico.

En resumen, en CA1 de hipocampos escleróticos existen sistemáticamente alteraciones vasculares severas, y por lo tanto pueden ser consideradas como una nueva característica histopatológica en la esclerosis de hipocampo. Para definir el significado funcional de estos cambios específicos de la red vascular de pacientes con ELT, serán necesarios estudios electrofisiológicos, junto con el análisis microanatómico y neuroquímico correlativo del tejido epiléptico. Dado que nuestro estudio demuestra una alteración evidente de los vasos sanguíneos en los hipocampos escleróticos, el estudio prequirúrgico del sistema vascular podría ser una herramienta muy útil a la hora de determinar la presencia de esclerosis del hipocampo en aquellos casos en los que la MRI no revela con claridad una atrofia del hipocampo. No debemos olvidar que en pacientes con ETL fármacorresistente, la posible presencia de esclerosis del hipocampo diagnosticada con MRI es una de las principales razones para la intervención quirúrgica. Así, nuestros estudios indican que cuando existe esclerosis del hipocampo, independientemente de que se detecte o no con MRI, tiene que existir una pérdida de vasos, y esto se traduce en que los estudios vasculares prequirúrgicos en estos casos no pueden ser normales. Es decir, un estudio vascular prequirúrgico detallado puede contribuir de una forma decisiva al tratamiento quirúrgico.

Este estudio ha sido recientemente aceptado para su publicación en la revista *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* (vid. Anexo).

5.2. ALTERACIONES DE LOS CIRCUITOS SINÁPTICOS EN EL HIPOCAMPO DE PACIENTES CON ELT

El análisis de la densidad sináptica en los hipocampos escleróticos mostró un descenso significativo según el grado de pérdida neuronal y gliosis, con respecto al tejido no esclerótico, lo que sugirió una correlación entre la presencia de alteraciones histológicas y el número de sinapsis.

En CA1 del hipocampo esclerótico se encontraron muy pocas sinapsis en el neuropilo, coincidiendo con una intensa gliosis y una pérdida neuronal masiva. Por lo que se puede decir que las pocas neuronas que sobreviven en CA1 están sinápticamente desconectadas de forma total o parcial. Esto concuerda con los datos obtenidos por Cohen y colaboradores cuyo estudio mostró que en CA1 del hipocampo esclerótico apenas se registraba actividad espontánea (Fig. 43), lo que hace improbable la participación de CA1 en la actividad epileptiforme (Cohen *et al.*, 2002). Por lo tanto, dicha actividad epileptiforme debe provenir de otras regiones del hipocampo.

Sorprendentemente, en la región de transición subículo/ CA1 del tejido esclerótico, la densidad y proporción de sinapsis asimétricas y simétricas era similar a la encontrada en el subículo, tanto de hipocampos escleróticos como no escleróticos, que aparentemente no mostraban alteraciones histológicas (vid. Fig. 36; Tablas 5, 6). Aunque no se encontraron cambios en la densidad sináptica del neuropilo de esta región de transición, se han encontrado numerosos cambios basados en microscopia óptica, como ya se ha

descrito (*vid.* apartado 5.1.2). Dichos cambios han sido propuestos como un sustrato neuroanatómico para las respuestas despolarizantes que se han registrado en la región de transición subículo/CA1 y el subículo (Muñoz *et al.*, 2007). Por lo tanto, nuestros datos acerca de la densidad sináptica, indican la existencia de numerosas sinapsis en dicha región de transición, y esto podría representar un sustrato morfológico para la actividad epileptiforme descrita previamente (Fig. 43; Cohen *et al.*, 2002).

En la región subículo/CA1 las aferencias sinápticas provienen de la arborización axónica de las pocas neuronas piramidales que sobreviven en CA1, así como de la corteza entorrinal (Duvernoy, 1998). En condiciones no patológicas, las neuronas piramidales de CA1 y de la corteza entorrinal envían sus axones a esta región de transición (*vid.* Fig. 6). Dado que en CA1 esclerótico hay una

pérdida neuronal masiva pero la densidad sináptica de la zona de transición es similar a la del subículo adyacente, es posible que haya un crecimiento axónico anómalo (*sprouting*) en CA1 esclerótico o en la corteza entorrinal, o en ambos, y que sea el producto de algún tipo de efecto compensatorio para suplir la pérdida de innervación proveniente del CA1 esclerótico.

Con respecto al subículo, generalmente, se considera que no presenta alteraciones histopatológicas aparentes en pacientes epilépticos con esclerosis del hipocampo (Babb *et al.*, 1984b; Gloor, 1991; Fisher *et al.*, 1998; Arellano *et al.*, 2004; Dawodu y Thom, 2005). Los datos obtenidos en el presente estudio apoyan estos hallazgos, ya que no se apreciaron variaciones en la densidad sináptica, ni otras alteraciones ultraestructurales en el neuropilo del subículo procedente del tejido esclerótico. El subículo recibe aferen-

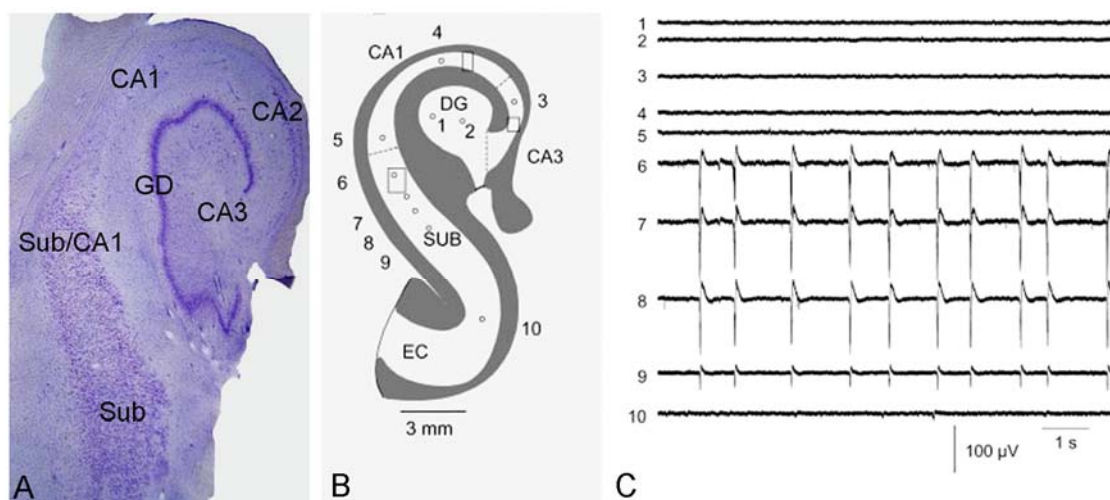


Fig. 43. A: Microfotografía de una sección teñida con el método de Nissl de la formación del hipocampo esclerótico. **B:** Esquema que representa un hipocampo esclerótico humano en el que se indican las diferentes regiones en las que se realizaron registros electrofisiológicos. **C:** Gráfico de los registros llevados a cabo en las regiones indicadas en B. Nótese la actividad sincrónica en los electrodos 6-9, situados en el subículo. Modificado de Cohen *et al.* (2002).

cias de las neuronas piramidales de CA1, y es la principal estructura de salida de información del hipocampo, y por lo tanto, la primera región en codificar la actividad neuronal que procede del hipocampo propio (Finch y Babb, 1981; Witter *et al.*, 1989; revisado en Stafstrom, 2005; DeFelipe *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que en pacientes epilépticos con esclerosis del hipocampo, cuyas crisis son originadas en estructuras mesiales, cuando se realiza una amígdalo-hipocampectomía selectiva tiene como resultado una peor prognosis que en aquellos casos en los que se reseca además la corteza cerebral adyacente (Siegel *et al.*, 1990). Por lo tanto, es muy probable que los cambios en los circuitos sinápticos presentes en el subículo del hipocampo esclerótico aparentemente normal, puedan amplificar las salidas excitadoras que provienen de la región de transición subículo/CA1, y así contribuir a la hiperexcitabilidad de la región mesial.

De hecho, en otros estudios realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que en el subículo aparentemente normal de los hipocampos escleróticos, hay una mayor densidad neuronal (42%) que en los hipocampos no escleróticos (Andrioli *et al.*, 2007). Estos datos, junto con el hecho de que el número de sinapsis sea similar tanto en el subículo de hipocampos escleróticos como en los no escleróticos, implican que la proporción de sinapsis por neurona que se establecen en los árboles dendríticos es menor en el tejido esclerótico. En dicho estudio se demostró que la proporción de células positivas para PV en el subículo de hipocampos escleróticos estaba reducida (hasta un 53%)

con respecto al tejido no esclerótico (Andrioli *et al.*, 2007). Las células PV-positivas, son interneuronas que incluyen a las células en cesto y en candelabro, y constituyen una de las principales fuentes de terminales axónicos perisomáticos de acción inhibitoria, y se consideran las interneuronas perisomáticas inhibitorias más potentes (DeFelipe *et al.*, 1999a; Szabadics *et al.*, 2006; Klausberger y Somogyi, 2008). Estas interneuronas perisomáticas del hipocampo inervan el soma, las dendritas proximales y el segmento inicial del axón de las células piramidales y controlan su actividad (Miles y Poncer, 1996; revisado en Freund y Katona, 2007).

Por lo tanto, la reducción relativa en el número de sinapsis por neurona, junto con la menor proporción de interneuronas PV-positivas en el subículo de hipocampos escleróticos, implica alteraciones en los circuitos sinápticos que afectan no sólo a la inervación perisomática (pérdida o disminución de células PV-positivas), sino también a nivel de la arborización dendrítica (descenso de sinapsis en el neuropilo). Sin embargo, no podemos determinar si ambos cambios contribuyen o no a la epilepsia, o bien sólo uno de ellos es epileptogénico mientras que el otro es el resultado de algún tipo de efecto compensatorio que no está relacionado con la epileptogenicidad.

5.3. HISTOPATOLOGÍA DE LA CORTEZA TEMPORAL DE PACIENTES CON ELT Y ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO

Se ha descrito que un porcentaje de los pacientes con esclerosis del hipocampo (5-30%) presentan patologías extrahipocampa-

les macroscópicas en la corteza temporal que pueden ser detectadas con MRI prequirúrgicamente (Levesque *et al.*, 1991; Raymond *et al.*, 1994; Prayson *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 1998; Blümcke *et al.*, 1999; Cendes *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Nishio *et al.*, 2000). Asimismo, a nivel de microscopía óptica, se ha descrito que las alteraciones extrahipocampales incluyen displasia cortical focal, organización minicolumnar anómala, desorganización de la arquitectura cortical, agrupaciones anómalas de neuronas, y pérdida neuronal laminar (Wolf *et al.*, 1993b; Prayson *et al.*, 1996; Kasper *et al.*, 1999; Kasper *et al.*, 2003; Nishio *et al.*, 2000; Tassi *et al.*, 2002; Kalnins *et al.*, 2004; revisado en Rickert, 2006; Hildebrandt *et al.*, 2005; Thom *et al.*, 2000; Thom *et al.*, 2005). Sin embargo, no existen estudios detallados de la microanatomía de la corteza temporal lateral en pacientes con esclerosis del hipocampo cuya MRI de la corteza temporal lateral sea normal.

En el presente estudio, el análisis histológico del tejido procedente de la corteza temporal lateral de 23 pacientes con ELT y esclerosis del hipocampo, reveló que un 87% presentaban alteraciones microscópicas, a pesar de que la MRI no mostraba patologías aparentes. Las principales alteraciones microscópicas encontradas en el presente estudio fueron: pérdida neuronal, alteraciones de la citoarquitectura, exceso de *corpora amillacea* y alteraciones vasculares. Además, en un 48% las alteraciones microscópicas coexistían (Tabla 7).

5.3.1. Pérdida neuronal

En el presente estudio la pérdida neuronal

constituye un 40% de las alteraciones microscópicas encontradas. Esta alteración se encontró mayoritariamente en las capas superficiales (capas II y III) de la neocorteza temporal de pacientes epilépticos. Algunos estudios anteriores han descrito pérdida neuronal en la capa III de la corteza entorrinal adyacente al hipocampo esclerótico (Du *et al.*, 1993), así como una disminución del número total de neuronas en capa IV de la neocorteza de pacientes epilépticos (Pedre *et al.*, 2008). La pérdida neuronal local podría afectar a las conexiones de la corteza con otras áreas corticales y subcorticales. Por ejemplo, las neuronas piramidales de capa II y III proyectan fundamentalmente a otras áreas corticales (Fig. 44); así, la pérdida neuronal en dichas capas implicaría una modificación en las conexiones cortico-corticales.

Se desconoce si la pérdida neuronal es primaria, es decir, causada por un factor desencadenante inicial (Meyer *et al.*, 1954; Cavanagh y Meyer, 1956; Falconer y Taylor, 1968; Sagar y Oxbury, 1987; French *et al.*, 1993; Spencer, 1998; Mathern *et al.*, 1995b; Mathern *et al.*, 1995c; Mathern *et al.*, 2002). O bien, es secundaria y podría deberse a un efecto neurotóxico inducido por la actividad epiléptica (Mathern *et al.*, 1995b; Mathern *et al.*, 1995c; Mathern *et al.*, 2002; revisado en Sloviter, 1999; Nishio *et al.*, 2000; Blümcke *et al.*, 2002). Existen numerosos estudios que indican que la actividad epiléptica puede inducir daño neuronal, tanto en modelos experimentales de epilepsia como en pacientes epilépticos. En modelos animales de epilepsia, se ha observado pérdida neuronal después de la inducción de focos

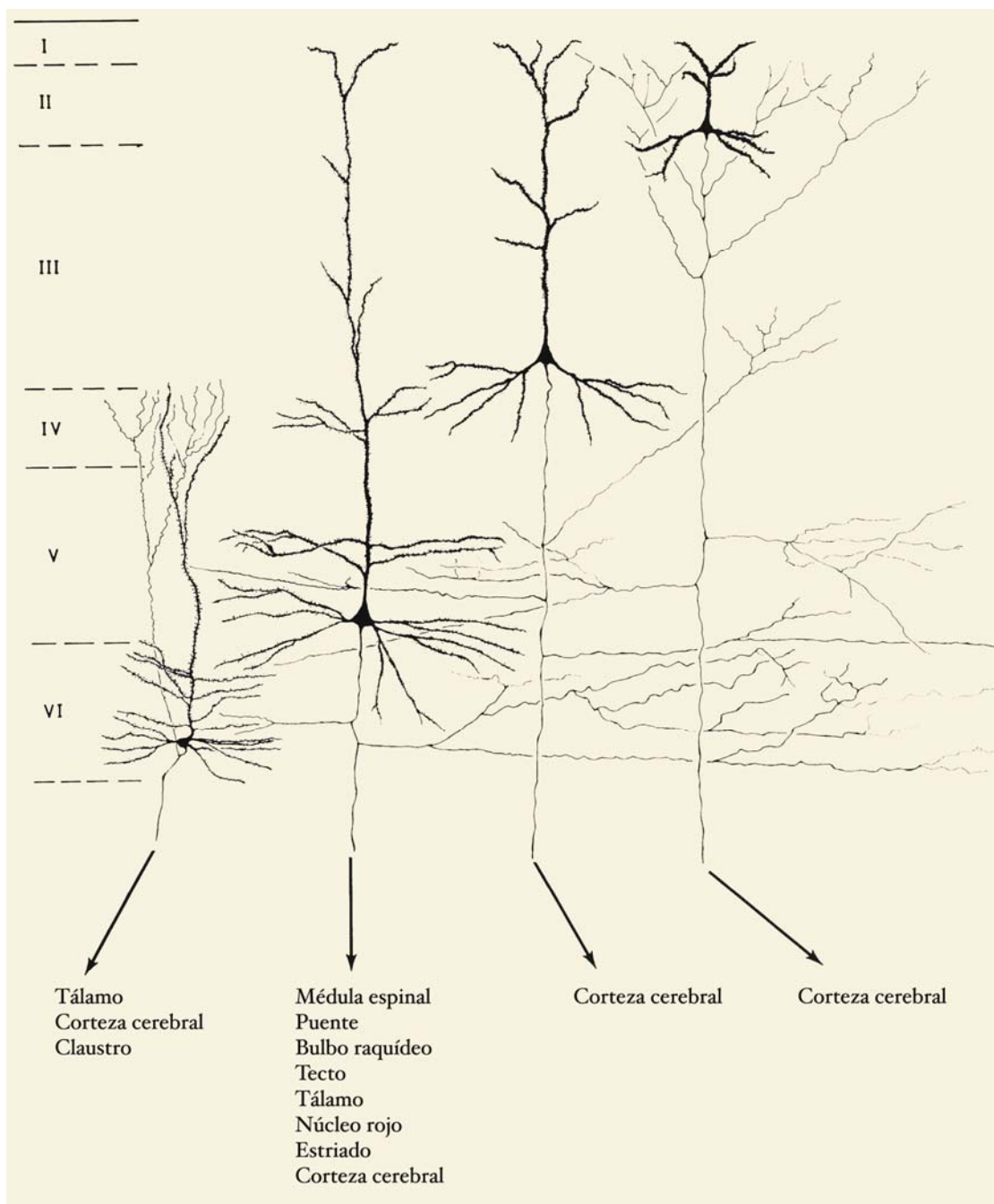


Fig. 44. Esquema de los principales sitios de proyección de las células piramidales según su localización laminar, basado principalmente en datos obtenidos en el macaco y en el gato. Modificado de Jones (1984).

epileptogénicos, provocados químicamente (con ácido kaínico o pilocarpina; Meldrum *et al.*, 1973; Ben-Ari *et al.*, 1980; Ben-Ari *et al.*, 1981; Schwob *et al.*, 1980; Lothman y Collins, 1981; Cavalheiro *et al.*, 1982; Turski *et al.*, 1983; revisado en Ben-Ari, 1985; Sperk, 1994; Houser y Esclapez, 1996), o

mediante estimulación electrofisiológica (Sloviter, 1983; Sutula *et al.*, 1988; Cavazos *et al.*, 1994; Sutula, 1990; Meldrum y Bruton, 1992; Sutula *et al.*, 1994; Löscher, 1997; Honavar y Meldrum, 1997; Sloviter, 1999). Lo que sugiere que la pérdida neuronal puede ser una consecuencia de la activi-

dad epiléptica, ya que se ha demostrado que la actividad epiléptica puede desencadenar procesos de muerte celular por vía apoptótica (Sutula, 1990; Du *et al.*, 1993; Sutula *et al.*, 1988; Sutula *et al.*, 1994; Sloviter, 1999; Pedre *et al.*, 2008).

Por otra parte, y de acuerdo con los estudios que apuntan a un factor desencadenante como el responsable de la pérdida neuronal, en este estudio un 40% de los pacientes escleróticos que tenían pérdida neuronal en la corteza temporal, presentaron crisis febriles en la primera infancia. Aunque, en la mayoría de los casos es una condición benigna y, generalmente, las personas que las padecen en la infancia no desarrollan epilepsia en la vida adulta (Verity, 1998; Verity *et al.*, 1998; revisado en Sloviter, 1999; Kasper *et al.*, 2003; revisado en Vestergaard y Christensen, 2009).

En resumen, no podemos establecer una relación de causalidad entre la pérdida neuronal de la corteza temporal y la actividad epiléptica.

5.3.2. Alteraciones citoarquitectónicas

En este trabajo, hemos encontrado alteraciones citoarquitectónicas en un 43% de los casos, que consistían en una desorganización de las capas corticales. Dichas alteraciones no se detectaron en estudios previos a la cirugía (MRI), y su correlación con alteraciones de la actividad cortical durante el registro intraoperatorio no era consistente, por lo que no hemos podido determinar su implicación en la epileptogénesis.

Asimismo, se desconoce el origen de las anomalías de la organización arquitectónica del cerebro, ya que pueden ser originadas

durante el desarrollo (Mathern *et al.*, 1995c; revisado en Palmini y Luders, 2002; Kalnins *et al.*, 2004; Thom *et al.*, 2000, Thom *et al.*, 2005; Marusic *et al.*, 2007), o como consecuencia de ataques epilépticos (Kalnins *et al.*, 2004). En otras patologías de la corteza (como en la displasia cortical), se ha propuesto que la presencia de alteraciones citoarquitectónicas podría estar relacionada con la epilepsia (Palmini y Luders, 2002, Kasper *et al.*, 2003; revisado en Palmini *et al.*, 2004; Kalnins *et al.*, 2004; Thom *et al.*, 2005; Fauser y Schulze-Bonhage, 2006; Marusic *et al.*, 2007). De hecho, una citoarquitectura anómala implica una alteración de las conexiones locales, lo que sin duda afectaría a la transferencia de información entre la corteza temporal, la corteza entorrinal, el subículo y los campos amigdalares del hipocampo (Insausti *et al.*, 1987; Stafstrom, 2005; DeFelipe *et al.*, 2007). Asimismo, el hecho de que las alteraciones no fueran homogéneas entre distintas regiones de un mismo paciente o entre pacientes diferentes, sugiere que las causas y/o el desarrollo de estas alteraciones son muy complejos y pueden afectar a una gran variedad de circuitos corticales. Además, algunas de las alteraciones pueden estar relacionadas con la epilepsia mientras que otras no podrían colaborar activamente con la epileptogenicidad.

5.3.3. Exceso de *corpora amilacea*

En el presente estudio un 40% de los pacientes analizados mostraron un acúmulo anormalmente abundante de *corpora amilacea* en el neuropilo de la corteza temporal lateral. Los *corpora amilacea* contienen principalmente un polímero de glucosa y

son supuestamente inertes electrofisiológicamente, lo que sugiere que este depósito no está involucrado de manera directa en la actividad epileptogénica. Sin embargo, al ser muy numerosos podrían modificar los circuitos sinápticos, pero no existen estudios que muestren lo que ocurre realmente. No obstante, la presencia abundante de *corpora amilacea* se considera normalmente un indicador de cambios degenerativos, ya que se encuentran en el tejido cerebral de individuos con edad avanzada y en procesos degenerativos (Duchen, 1992; Van Paesschen *et al.*, 1997; Nishio *et al.*, 2000; Nishio *et al.*, 2001; de Castro Ribeiro *et al.*, 2003). Dado que la edad de los pacientes donde hemos encontrado numerosos *corpora amilacea* era solamente de entre 31 y 53 años (con un promedio de 41 años) lo más probable es que este hallazgo esté relacionado con cambios degenerativos causados por epilepsia.

De hecho, la presencia de *corpora amilacea* se ha relacionado con el daño celular causado por los ataques epilépticos, la respuesta glial, o el resultado de un metabolismo celular incrementado (Nishio *et al.*, 2001). Igualmente, se ha descrito que en pacientes con esclerosis del hipocampo, el patrón del EEG tiene una frecuencia más alta en aquellos con abundante *corpora amilacea* (Radhakrishnan *et al.*, 2007). No obstante, en el presente estudio no hemos encontrado una relación clara entre el patrón de actividad y la existencia de *corpora amilacea*. La presencia de *corpora amilacea* también se ha correlacionado con la duración de la epilepsia (Radhakrishnan *et al.*, 2007), lo que coincide con nuestro análisis, ya que los pacientes con esta alteración microscópica pre-

sentaban un largo historial de epilepsia con una media de 32 años de duración (con un rango de entre 20-40 años).

En algunos pacientes que presentaban pérdida neuronal en la corteza temporal lateral, hemos encontrado abundantes *corpora amilacea* cuya localización coincidía con dichas áreas de pérdida neuronal, lo que concuerda con estudios anteriores realizados en el hipocampo esclerótico (revisado en Nishio *et al.*, 2001). Se ha propuesto que en las áreas de pérdida neuronal del hipocampo esclerótico, los *corpora amilacea* reemplazan a las células (Nishio *et al.*, 2001; Radhakrishnan *et al.*, 2007). Sin embargo, según el presente trabajo los *corpora amilacea* se encontraron sólo en algunas zonas de pérdida neuronal, es decir, que su presencia no está restringida a las regiones con pérdida neuronal.

En resumen, un 40% de los casos de los pacientes con esclerosis del hipocampo presenta numerosos *corpora amilacea* en la corteza temporal lateral pero no podemos establecer una relación clara con la epilepsia.

5.3.4. Alteraciones vasculares

La ELT esta asociada con alteraciones del funcionamiento de sistema cardiovascular y cerebrovascular (revisado en Dutsch *et al.*, 2004). Se ha descrito que después de la cirugía de la ELT, se observa una disminución de la presión sanguínea en los pacientes operados (Dutsch *et al.*, 2004). La presencia de alteraciones vasculares puede inducir y/o agravar la epilepsia focal tanto en humanos (Van Vliet *et al.*, 2007), como en modelos animales de epilepsia (Seiffert *et al.*, 2004). Esto sugiere una posible relación entre las

crisis epilépticas y las alteraciones vasculares.

Efectivamente, en el presente estudio las alteraciones vasculares constituían un 35% de las alteraciones presentes en la corteza temporal de los pacientes epilépticos. Las angiopatías más frecuentes encontradas en el presente trabajo fueron el ensanchamiento del espacio perivascular e infiltración perivascular.

La dilatación de espacio perivascular no relacionada con epilepsia se describió por primera vez en el año 1842 por Durand-Fardel (Durand-Fardel, 1842) como *État criblé*, y está relacionada con la hipertensión arterial. Igualmente, se considera un cambio degenerativo relacionado con la edad avanzada (Nishio *et al.*, 2000). Puesto que los pacientes estudiados eran relativamente jóvenes (*vid.* apartado 5.3.3), y no mostraban hipertensión arterial, la presencia de alteraciones vasculares podría estar relacionada con la epileptogenicidad de la corteza. Otros estudios anteriores en pacientes epilépticos han descrito la dilatación del espacio perivascular (Nishio *et al.*, 2000), o/y angiopatía espongiiforme (Hildebrandt *et al.*, 2008) que no se observa en el tejido control procedente de autopsias. Por lo tanto, la dilatación del espacio perivascular podría representar una manifestación microscópica de dichas alteraciones, pero su relación con la actividad epiléptica no está clara.

Por otra parte, la infiltración perivascular también se ha relacionado con el daño cerebral producido por los ataques epilépticos. En estudios anteriores se han descrito cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y en el metabolismo de pacien-

tes con ELT (revisado en Oby y Janigro, 2006). En modelos murinos de epilepsia se ha descrito una infiltración perivascular anómala de linfocitos en el parénquima cerebral, debido a cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Aihara *et al.*, 1995; Cook y Persinger, 1999), lo que se considera un cambio inflamatorio (revisado en Nishio *et al.*, 2000) favorecido por los ataques epilépticos (Cook y Persinger, 1999).

Así pues, las alteraciones vasculares encontradas en el presente estudio probablemente tienen relación con la actividad epiléptica, pero se desconoce su naturaleza porque sólo se encuentran en ciertas regiones de la corteza temporal lateral de determinados pacientes con esclerosis de hipocampo.

5.3.5. Relación entre alteraciones microscópicas de la corteza temporal lateral y epileptogénesis

Cuando en la cirugía de epilepsia de lóbulo temporal se elimina el hipocampo esclerótico, donde teóricamente se originan las crisis, la actividad epiléptica debería cesar si el daño se encontrase solamente allí. Sin embargo, en la mayoría de los casos, como hemos mostrado en el presente trabajo, la corteza temporal también presenta alteraciones epileptogénicas y si no se resecan estas zonas afectadas, la actividad epileptiforme podría persistir.

En modelos experimentales de epilepsia se pueden reconocer dos tipos de zonas epileptogénicas: primaria y secundaria.

La zona epileptogénica primaria es la región del cerebro donde la actividad epiléptica se origina por primera vez.

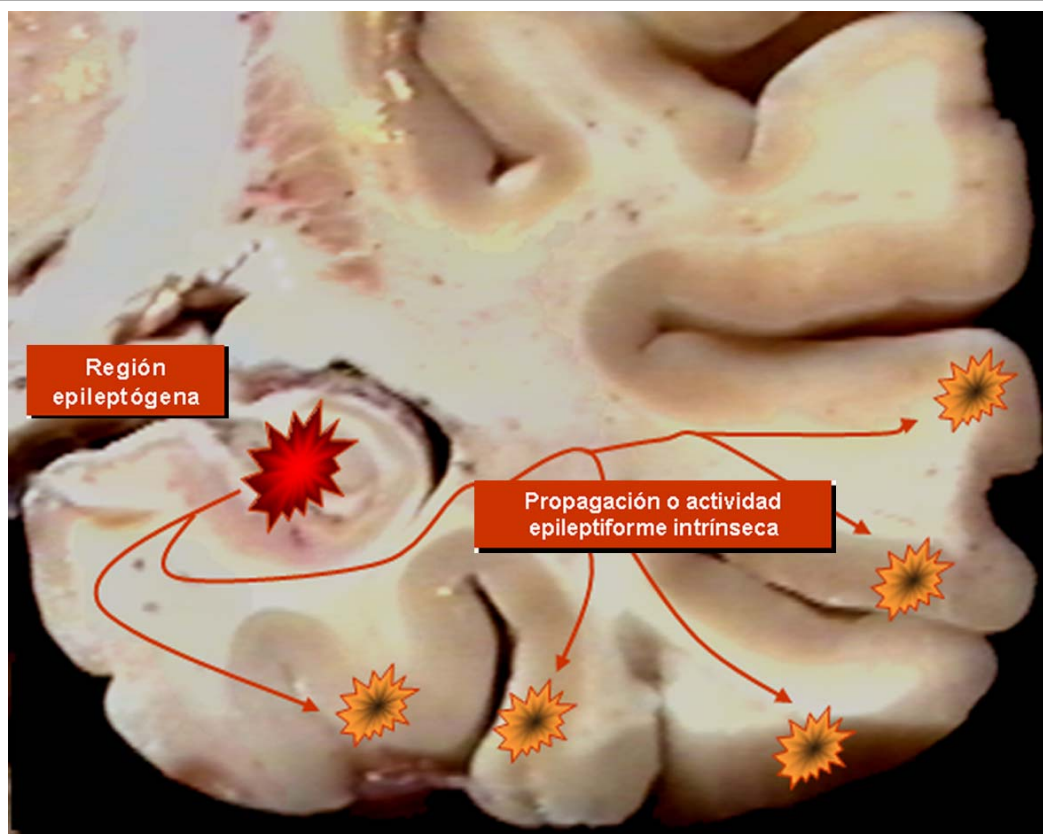


Fig. 45. Representación esquemática de la propagación de la actividad epileptiforme en el hipocampo y corteza temporal adyacente. El hipocampo esclerótico puede generar actividad epileptiforme que se propaga a través de subículo hacia la corteza temporal. La corteza temporal presenta actividad epileptógena intrínseca, inducida secundariamente por el daño producido por la actividad epileptiforme procedente del hipocampo esclerótico. Alternativamente, pueden representar alteraciones epileptogénicas no relacionadas con la esclerosis de hipocampo.

La zona epileptogénica secundaria es la región (o regiones) del cerebro que originan la actividad epiléptica independientemente de la zona epileptogénica primaria y que se produce como resultado de la actividad epiléptica proyectada desde la zona primaria (Figs. 45, 46). Es decir, que la zona epileptogénica primaria puede causar lesiones en otras áreas de la corteza más o menos alejadas, induciendo así la aparición de zonas epileptogénicas secundarias. La presencia de estas regiones secundarias en los pacientes epilépticos tiene una gran relevancia clínico-quirúrgica, puesto que pueden agravar la evolución de la enfermedad y contribuir al

fracaso de la cirugía de la epilepsia si no se resecan junto a la zona primaria (Mayanagi *et al.*, 1996; Munari *et al.*, 2000; Hennessy *et al.*, 2000).

En la intervención quirúrgica de la epilepsia fármacorresistente se realizan estudios previos detallados para localizar las zonas de la corteza alteradas. El objetivo es modificar los límites de la resección para que la intervención sea más eficaz y quede restringida a las zonas de la corteza que pueden estar implicados en la generación de la actividad epileptogénica.

Así pues, no sabemos con certeza el significado de las alteraciones microscópicas en-

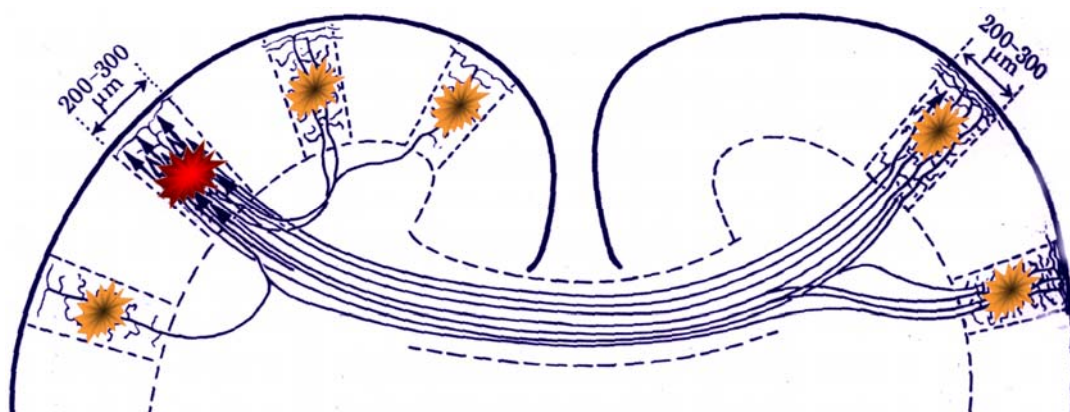


Fig. 46. Esquema para ilustrar la generación de zonas epileptógenas secundarias. En rojo aparece representada una región epileptógena primaria que genera crisis, y se conecta con otras áreas corticales más o menos cercanas por medio de los axones de proyección de las células piramidales. Estas regiones conectadas pueden llegar a ser zonas epileptógenas secundarias (en naranja) como consecuencia de alteraciones en las propiedades de las células diana inervadas por la región primaria, y podrían llegar a ser capaces de generar crisis epilépticas de forma independiente.

contradas en la corteza lateral de los pacientes epilépticos analizados, pero dado que su frecuencia es elevada creemos que están relacionadas con la epileptogenicidad. Según las pruebas clínicas previas a la intervención, el estudio histológico del tejido reseca- do y el seguimiento del paciente tras la cirugía, podemos clasificar los resultados en varios grupos:

Aquellos pacientes en los que la cirugía resultó favorable y en los que se encontraron alteraciones microscópicas en la corteza temporal lateral. Podrían representar aquellos casos (muy comunes) que muestran actividad anómala en el registro cortical tanto en hipocampo, como en la corteza temporal. En estos casos la epilepsia podría ser causada por ambas regiones.

Pacientes con un resultado de cirugía favorable y en los que no hemos encontrado ninguna alteración en la corteza lateral. Podría significar que la alteración que causaba la epilepsia estaba restringida al hipocampo y que se eliminó con éxito, o

bien que la alteración presente en la corteza temporal extirpada pasó desapercibida.

Pacientes cuyo resultado de la cirugía fue poco favorable y con alteraciones en la corteza temporal lateral. Es posible que la lesión estuviera más extendida de los límites de resección por lo que sigue causando crisis (Tassi *et al.*, 2002; Nakasato *et al.*, 1992; Berkovic *et al.*, 1995; Kuzniecky *et al.*, 1999; Kalnins *et al.*, 2004).

Pacientes en los que la cirugía resultó poco favorable y no se detectaron alteraciones. La ausencia de anomalías estructurales puede significar que hubiera cambios a nivel celular o molecular, que no se detectaron a nivel microanatómico; o bien que el tejido tenía alguna alteración microscópica que se perdió durante la intervención quirúrgica (revisado en Wolf *et al.*, 1993a; Wolf *et al.*, 1993b). Según algunos autores (Tassi *et al.*, 2002), puede existir otra posibilidad: el tejido reseca- do contenía el foco epileptogénico pero tras la cirugía se activa una nueva zona, previamente silente (Fig. 46). Por

ejemplo, los axones de las células piramidales cercanas a las regiones corticales donde existe una pérdida de neuronas, o próximas a la línea de resección quirúrgica, pueden sufrir un proceso de crecimiento y neosinaptogénesis que incrementa las conexiones excitadoras locales (Marco y DeFelipe, 1997; McKinney *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 2000).

Por otra parte, dado que las alteraciones microscópicas corticales no son intrínsecamente epileptogénicas, y que también se observan en pacientes que no desarrollan epilepsia, puede ser que la corteza temporal no estuviera implicada en la generación de las

crisis. Así, es posible que el hipocampo siga causando las crisis porque los límites de resección no fueron suficientemente amplios como para extirpar las regiones alteradas (Fig. 14).

Por lo tanto, en este estudio no hemos podido establecer una relación evidente entre las alteraciones microanatómicas con la epileptogenicidad del tejido, pero puede ser que la actividad epiléptica procedente del hipocampo dañe la corteza temporal, produciendo las alteraciones microscópicas y creando focos activos, que a su vez pueden contribuir a la intensificación y/o propagación de la actividad epiléptica.

CONCLUSIONES

ALTERACIONES DE LA VASCULARIZACIÓN DEL HIPOCAMPO:

1. Existe una disminución consistente de vasos sanguíneos (hasta un 70%) en CA1 del hipocampo esclerótico de pacientes con ELT.
2. Los vasos encontrados en CA1 de los hipocampos escleróticos donde la pérdida neuronal fue severa, presentaban una morfología alterada, que consistía principalmente en una atrofia con una reducción considerable del lumen capilar.
3. Estos cambios en la arquitectura vascular de CA1 sugieren graves alteraciones del flujo sanguíneo.

ALTERACIONES DE LOS CIRCUITOS SINÁPTICOS DEL HIPOCAMPO:

4. El análisis de la densidad sináptica total en el neuropilo mostró un descenso significativo en CA1 esclerótico, según el grado de pérdida neuronal y gliosis, lo que sugiere una relación entre la presencia de alteraciones histológicas y el número de sinapsis. Las pocas neuronas que sobreviven en CA1 esclerótico están en gran medida sinápticamente desconectadas.
5. En la región de transición subículo/ CA1 del hipocampo esclerótico, la densidad y proporción de sinapsis era similar a la encontrada en el subículo de hipocampos no escleróticos a pesar de las alteraciones histológicas presentes en esta región. Esto sugiere que existe una reorganización sináptica que podría representar el sustrato para la actividad epileptiforme.
6. En el subículo procedente del tejido esclerótico no se apreciaron diferencias significativas en la densidad sináptica ni otras alteraciones ultraestructurales. No obstante, puesto que la densidad neuronal en estos casos es mayor hay una reducción relativa en el número de sinapsis excitadoras por neurona.
7. No podemos determinar si los cambios observados en los circuitos sinápticos contribuyen a la epilepsia, o bien sólo alguno de ellos es epileptogénico, mientras que otras alteraciones son el resultado de algún tipo de efecto compensatorio no relacionado con la epileptogenicidad.

ALTERACIONES EN LA CORTEZA LATERAL DE PACIENTES CON ELT Y ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO:

8. En el presente estudio, el análisis histológico del tejido procedente de la corteza temporal lateral de 23 pacientes con ELT y esclerosis del hipocampo, reveló que un 87% presentaban alteraciones microscópicas, a pesar de que la MRI no mostraba patologías aparentes.

9. Las principales alteraciones microscópicas encontradas fueron: pérdida neuronal (40%), alteraciones de la citoarquitectura (43%), profusión de *corpora amilacea* (40%) y alteraciones vasculares (35%).

10. No hemos podido establecer una relación evidente entre las alteraciones microanatómicas con la epileptogenicidad del tejido, pero puede ser que la actividad epiléptica procedente del hipocampo dañe la corteza temporal, produciendo alteraciones microscópicas y creando focos activos, que a su vez pueden contribuir a la intensificación y/o propagación de la actividad epiléptica.

BIBLIOGRAFÍA

- Aihara N, Hall JJ, Pitts LH, Fukuda K, Noble LJ (1995). Altered immunoexpression of microglia and macrophages after mild head injury. *JNeurotrauma* 12(1): 53-63.
- Alexander GM, Godwin DW (2006). Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Res* 71(1): 1-22.
- Alonso-Nanclares L, White EL, Elston GN, DeFelipe J (2004). Synaptology of the proximal segment of pyramidal cell basal dendrites. *EurJNeurosci* 19(3): 771-776.
- Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Rodriguez JR, DeFelipe J (2008). Gender differences in human cortical synaptic density. *ProcNatAcadSciUSA* 105 (38): 14615-14619.
- Alvarez-Leefmans FJ, Leon-Olea M, Mendoza-Sotelo J, Alvarez FJ, Anton B, Garduno R (2001). Immunolocalization of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience* 104(2): 569-582.
- Amaral DG, Insausti R (1990). Hippocampal formation. In: Paxinos G (ed). *The Human Nervous System*. Academic Press: New York, pp 711-755.
- Amaral DG, Insausti R, Cowan WM (1987). The entorhinal cortex of the monkey: I. Cytoarchitectonic organization. *JComp Neurol* 264(3): 326-355.
- Andersen P, Holmqvist B, Voorhoeve PE (1966). Entorhinal activation of dentate granule cells. *Acta Physiol Scand* 66(4): 448-460.
- Andrioli A, Alonso-Nanclares L, Arellano JI, DeFelipe J (2007). Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. *Neuroscience* 149(1): 131-143.
- Annegers JF (1993). The epidemiology of epilepsy. In: Wyllie E (ed). *The Treatment of Epilepsy*. Lea & Febiger: Philadelphia, pp 157-164.
- Arellano JI, Ballesteros-Yanez I, DeFelipe J, Munoz A, Sola RG (2004). Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* 127(Pt 1): 45-64.
- Argumosa A, Herranz JL (2005). [The clinical and economic impact of generic drugs in the treatment of epilepsy]. *RevNeurol* 41(1): 45-49.
- Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, Redeker S, Ozbas-Gerceker F, Van Vliet EA, Scheffer GL, Scheper RJ, van dV, Baayen JC, Troost D (2004). Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 45(5): 441-451.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, DeFelipe J, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvarday ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Munoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *NatRev Neurosci* 9(7): 557-568.
- Avoli M (1983). Is epilepsy a disorder of inhibition or excitation? *ProgClinBiolRes* 124: 23-37.
- Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Kohling R, Biagini G, Pumain R, D'Arcangelo G, Tancredi V (2002). Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *ProgNeurobiol* 68(3): 167-207.
- Awad IA, Chelune GJ (1993). Epilepsy Surgery. Outcome and complications. In: Wyllie E (ed). *The treatment of epilepsy: principles and practice*. Lea & Febiger: Philadelphia, pp 1084-1091.
- Babb TL, Brown WJ (1986). Neuronal, dendritic, and vascular profiles of human temporal lobe epilepsy correlated with cellular physiology in vivo.

AdvNeurol 44: 949-966.

Babb TL, Brown WJ (1987). Pathological findings in epilepsy. In: Engel J (ed). *Surgical treatment of the epilepsies*. Raven Press: New York.

Babb TL, Brown WJ, Pretorius J, Davenport C, Lieb JP, Crandall PH (1984a). Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 25 (6): 729-740.

Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF (1991). Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 42(2): 351-363.

Babb TL, Lieb JP, Brown WJ, Pretorius J, Crandall PH (1984b). Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia* 25(6): 721-728.

Babb TL, Pretorius JK (1993). Pathologic substrates of epilepsy. In: Wyllie E (ed). *The treatment of epilepsy: principles and practice*. Lea & Febiger: Philadelphia, pp 55-70.

Babb TL, Ying Z, Mikuni N, Nishiyama K, Drazba J, Bingaman W, Wyllie E, Wylie CJ, Yacubova K (2000). Brain plasticity and cellular mechanisms of epileptogenesis in human and experimental cortical dysplasia. *Epilepsia* 41 Suppl 6: S76-S81.

Bailey P, Von Bonin G (1951). The isocortex of man. University of Illinois Press edn. University of Illinois Press.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *NeurobiolDis* 16(1): 1-13.

Bannister RG, Romanul FC (1963). The Localization of Alkaline Phosphatase Activity in Cerebral Blood Vessels. *JNeurolNeurosurgPsychiatry* 26: 333-340.

Bausch SB (2005). Axonal sprouting of GABAergic interneurons in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy*

Behav 7(3): 390-400.

Bell MA, Scarrow WG (1984). Staining for microvascular alkaline phosphatase in thick celloidin sections of nervous tissue: morphometric and pathological applications. *MicrovascRes* 27(2): 189-203.

Ben-Ari Y (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14 (2): 375-403.

Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP, Meldrum BS (1980). The role of epileptic activity in hippocampal and "remote" cerebral lesions induced by kainic acid. *Brain Res* 191(1): 79-97.

Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R (1981). Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 6(7): 1361-1391.

Berkovic SF, McIntosh AM, Kalnins RM, Jackson GD, Fabinyi GC, Brazenor GA, Bladin PF, Hopper JL (1995). Preoperative MRI predicts outcome of temporal lobectomy: an actuarial analysis. *Neurology* 45(7): 1358-1363.

Blümcke I, Becker AJ, Klein C, Scheiwe C, Lie AA, Beck H, Waha A, Friedl MG, Kuhn R, Emson P, Elger C, Wiestler OD (2000). Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *JNeuropatholExpNeurol* 59(1): 1-10.

Blümcke I, Lobach M, Wolf HK, Wiestler OD (1999). Evidence for developmental precursor lesions in epilepsy-associated glioneuronal tumors. *MicroscResTech* 46(1): 53-58.

Blümcke I, Thom M, Wiestler OD (2002). Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder

- associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 12(2): 199-211.
- Bourgeois JP, Goldman-Rakic PS, Rakic P (1994). Synaptogenesis in the prefrontal cortex of rhesus monkeys. *CerebCortex* 4(1): 78-96.
- Bourgeois JP, Rakic P (1993). Changes of synaptic density in the primary visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stage. *JNeurosci* 13(7): 2801-2820.
- Braak H (1980). *Architectonicsof the human telencephalic cortex. Studies on brain function* Springer-Verlag: Berlin, 24-62pp.
- Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY, Coulter DA (1998). Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *NatMed* 4(10): 1166-1172.
- Brown TH, Zador AM (1990). The hippocampus. In: Shepherd GM (ed). *Synaptic Organization of the Brain*. Oxford Univ. Press.: New York, pp 346-388.
- Brown WR, Moody DM, Thore CR, Challa VR, Anstrom JA (2007). Vascular dementia in leukoaraiosis may be a consequence of capillary loss not only in the lesions, but in normal-appearing white matter and cortex as well. *JNeurol Sci* 257(1-2): 62-66.
- Caffo M, Germano A, Caruso G, Meli F, Galatioto S, Sciacca MP, Tomasello F (2004). An immunohistochemical study of extracellular matrix proteins laminin, fibronectin and type IV collagen in paediatric glioblastoma multiforme. *Acta Neurochir (Wien)* 146(10): 1113-1118.
- Cajal SR (1892). El nuevo concepto de la histología de los centros nerviosos. *RevCiencias M,d* 18: 457-476.
- Cajal SR (1893). Estructura del Asta de Ammon. *Sociedad Española de Historia Natural*.
- Cajal SR (1899). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados* Moya: Madrid.
- Cajal SR (1901). *Estudios sobre la corteza cerebral humana. IV. Estructura de la corteza cerebral olfativa del hombre y mamíferos*. Trab. Lab. Invest. Biol. Univ.: Madrid, 1-140pp.
- Cajal SR (1911). *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres* Maloine: Paris.
- Calhau C, Hipolito-Reis C, Azevedo I (1999). Alkaline phosphatase and exchange surfaces. *ClinBiochem* 32(2): 153-154.
- Cavada C, Company T, Tejedor J, Cruz-Rizzolo RJ, Reinoso-Suarez F (2000). The anatomical connections of the macaque monkey orbitofrontal cortex. A review. *CerebCortex* 10(3): 220-242.
- Cavalheiro EA, Riche DA, Le Gal La SG (1982). Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 53(6): 581-589.
- Cavanagh JB, Meyer A (1956). Aetiological aspects of Ammon's horn sclerosis associated with temporal lobe epilepsy. *BrMed J* 2(5006): 1403-1407.
- Cavazos JE, Das I, Sutula TP (1994). Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *JNeurosci* 14(5 Pt 2): 3106-3121.
- Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP (1991). Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *JNeurosci* 11(9): 2795-2803.
- Cavazos JE, Jones SM, Cross DJ (2004). Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience* 126 (3): 677-688.
- Cavazos JE, Sutula TP (1990). Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for

BIBLIOGRAFÍA

- mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res* 527(1): 1-6.
- Cendes F, Li LM, Andermann F, Watson C, Fish DR, Shorvon SD, Dubeau F, Arnold DL (1999). Dual pathology and its clinical relevance. *AdvNeurol* 81: 153-164.
- Cohen AS, Lin DD, Quirk GL, Coulter DA (2003). Dentate granule cell GABA(A) receptors in epileptic hippocampus: enhanced synaptic efficacy and altered pharmacology. *EurJNeurosci* 17(8): 1607-1616.
- Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 298 (5597): 1418-1421.
- Colonnier M (1968). Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res* 9 (2): 268-287.
- Consensus (1981) Consensus development conference on febrile seizures. pp 377-381.
- Conti F, DeFelipe J, Farinas I, Manzoni T (1989). Glutamate-positive neurons and axon terminals in cat sensory cortex: a correlative light and electron microscopic study. *JComp Neurol* 290(1): 141-153.
- Conti F, Rustioni A, Petrusz P, Towle AC (1987). Glutamate-positive neurons in the somatic sensory cortex of rats and monkeys. *JNeurosci* 7(6): 1887-1901.
- Cook LL, Persinger MA (1999). Infiltration of lymphocytes in the limbic brain following stimulation of subclinical cellular immunity and low dosages of lithium and a cholinergic agent. *ToxicolLett* 109(1-2): 77-85.
- Cotman CW, Nadler JV (1978). Reactive synaptogenesis in the hippocampus. *Neuronal plasticity*. Raven Press: New York, pp 227-271.
- Coulter DA (2000). Mossy fiber zinc and temporal lobe epilepsy: pathological association with altered "epileptic" gamma-aminobutyric acid A receptors in dentate granule cells. *Epilepsia* 41 Suppl 6: S96-S99.
- Cullen KM, Kocsi Z, Stone J (2006). Microvascular pathology in the aging human brain: evidence that senile plaques are sites of microhaemorrhages. *NeurobiolAging* 27(12): 1786-1796.
- Chapman AG, Elwes RD, Millan MH, Polkey CE, Meldrum BS (1996). Role of glutamate and aspartate in epileptogenesis; contribution of microdialysis studies in animal and man. *Epilepsy ResSuppl* 12: 239-246.
- Dawodu S, Thom M (2005). Quantitative neuropathology of the entorhinal cortex region in patients with hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 46(1): 23-30.
- de Castro Ribeiro M, Barbosa-Coutinho L, Fabiana M, Arlete H, Andr, P, Costa da Costa J, Paglioli Neto E, Paglioli E (2003). Corpora amylacea in temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* 61(4): 942-945.
- de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD (1989). Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 495(2): 387-395.
- DeFelipe J (1993a). Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *CerebCortex* 3(4): 273-289.
- DeFelipe J (1993b). A study of NADPH diaphorase-positive axonal plexuses in the human temporal cortex. *Brain Res* 615(2): 342-346.
- DeFelipe J (1999). Chandelier cells and epilepsy. *Brain* 122 (Pt 10): 1807-1822.
- DeFelipe J (2002). Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *ProgBrain Res* 136: 215-238.
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI (2002).

- Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *JNeurocytol* 31(3-5): 299-316.
- DeFelipe J, Conti F, Van Eyck SL, Manzoni T (1988). Demonstration of glutamate-positive axon terminals forming asymmetric synapses in cat neocortex. *Brain Res* 455(1): 162-165.
- DeFelipe J, Fairén A (1993). A simple and reliable method for correlative light and electron microscopic studies. *JHistochemCytochem* 41(5): 769-772.
- DeFelipe J, Farinas I (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *ProgNeurobiol* 39(6): 563-607.
- DeFelipe J, Fernandez-Gil MA, Kastanauskaite A, Bote RP, Presmanes YG, Ruiz MT (2007). Macroanatomy and microanatomy of the temporal lobe. *SeminUltrasound CT MR* 28(6): 404-415.
- DeFelipe J, Garcia SR, Marco P, del Rio MR, Pulido P, Cajal S (1993). Selective changes in the microorganization of the human epileptogenic neocortex revealed by parvalbumin immunoreactivity. *CerebCortex* 3(1): 39-48.
- DeFelipe J, Gonzalez-Albo MC, del Rio MR, Elston GN (1999a). Distribution and patterns of connectivity of interneurons containing calbindin, calretinin, and parvalbumin in visual areas of the occipital and temporal lobes of the macaque monkey. *JComp Neurol* 412(3): 515-526.
- DeFelipe J, Marco P, Busturia I, Merchan-Perez A (1999b). Estimation of the number of synapses in the cerebral cortex: methodological considerations. *CerebCortex* 9(7): 722-732.
- DeGarengot (1742). *Splanchnologie ou lianatomie des viscères*: Paris, 250-251pp.
- del Zoppo GJ, Mabuchi T (2003). Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *JCerebBlood Flow Metab* 23(8): 879-894.
- Delpire E, Mount DB (2002). Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *AnnuRev Physiol* 64: 803-843.
- Dietrich D, Clusmann H, Kral T, Steinhäuser C, Blumcke I, Heinemann U, Schramm J (1999). Two electrophysiologically distinct types of granule cells in epileptic human hippocampus. *Neuroscience* 90(4): 1197-1206.
- Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben-Ari Y, Esclapez M (2003). Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *JComp Neurol* 459(4): 407-425.
- Drake CT, Iadecola C (2007). The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow. *Brain Lang* 102(2): 141-152.
- Du F, Whetsell WO, Jr., bou-Khalil B, Blumenkopf B, Lothman EW, Schwarcz R (1993). Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 16(3): 223-233.
- Duchen LW (1992). General pathology of neurons and neuroglia. In: Adams JH (ed). *Greenfield's neuropathology*: London. Vol 5th ed, pp 1-68.
- Durand-Fardel M (1842). Mémoire sur une altération particulière de la substance cérébrale *Gaz Med Paris* 10: 23-38.
- Dutsch M, Devinsky O, Doyle W, Marthol H, Hilz MJ (2004). Cerebral autoregulation improves in epilepsy patients after temporal lobe surgery. *JNeurol* 251(10): 1190-1197.
- Duvernoy HM (1998). The Human Hippocampus. *The Human Hippocampus*. Springer: Berlin.
- Eid T, Brines ML, Cerami A, Spencer DD, Kim JH, Schweitzer JS, Ottersen OP, de Lanerolle NC (2004). Increased expression of erythropoietin receptor on blood vessels in the human epileptogenic

BIBLIOGRAFÍA

- hippocampus with sclerosis. *JNeuropatholExpNeurol* 63(1): 73-83.
- Engel J, Jr. (1987). Outcome with respect to epileptic seizures. *Surgical treatment of epilepsies*. Raven Press.: New York, pp 553-571.
- Engel J, Jr. (1993). Epilepsy Surgery. Historical perspectives and future directions. In: Wyllie E (ed). *The Treatment of Epilepsy*. Lea & Febirger: Philadelphia, pp 989-998.
- Engel J, Jr. (2003). A Greater Role for Surgical Treatment of Epilepsy: Why and When? *Epilepsy Curr* 3(2): 37-40.
- Erakovic V, Zupan G, Varljen J, Laginja J, Simonic A (2001). Altered activities of rat brain metabolic enzymes in electroconvulsive shock-induced seizures. *Epilepsia* 42(2): 181-189.
- Esclapez M, Hirsch JC, Ben-Ari Y, Bernard C (1999). Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. *JComp Neurol* 408(4): 449-460.
- Fabri M, Manzoni T (1996). Glutamate decarboxylase immunoreactivity in corticocortical projecting neurons of rat somatic sensory cortex. *Neuroscience* 72(2): 435-448.
- Fairén A, DeFelipe J, Regidor J, Peters A JEG (1984). Non pyramidal neurons. General account. *Cerebral Cortex. Cellular Components of the Cerebral Cortex*. Plenum Press: New York, pp 201-253.
- Falconer MA, Serafetinides EA, Corsellis JA (1964). Etiology and Pathogenesis of Temporal Lobe Epilepsy. *ArchNeurol* 10: 233-248.
- Falconer MA, Taylor DC (1968). Surgical treatment of drug-resistant epilepsy due to mesial temporal sclerosis. Etiology and significance. *ArchNeurol* 19 (4): 353-361.
- Fausser S, Schulze-Bonhage A (2006). Epileptogenicity of cortical dysplasia in temporal lobe dual pathology: an electrophysiological study with invasive recordings. *Brain* 129(Pt 1): 82-95.
- Fawcett DW (1987). *Tratado de Histología*: Madrid, 369-403pp.
- Finch DM, Babb TL (1981). Demonstration of caudally directed hippocampal efferents in the rat by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Res* 214(2): 405-410.
- Fisher PD, Sperber EF, Moshe SL (1998). Hippocampal sclerosis revisited. *Brain Dev* 20(8): 563-573.
- Fonta C, Imbert M (2002). Vascularization in the primate visual cortex during development. *CerebCortex* 12(2): 199-211.
- Fonta C, Negyessy L, Renaud L, Barone P (2004). Areal and subcellular localization of the ubiquitous alkaline phosphatase in the primate cerebral cortex: evidence for a role in neurotransmission. *CerebCortex* 14(6): 595-609.
- Fonta C, Negyessy L, Renaud L, Barone P (2005). Postnatal development of alkaline phosphatase activity correlates with the maturation of neurotransmission in the cerebral cortex. *JComp Neurol* 486(2): 179-196.
- French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD (1993). Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *AnnNeurol* 34(6): 774-780.
- Freund TF, Katona I (2007). Perisomatic inhibition. *Neuron* 56(1): 33-42.
- Friede RL (1966). A quantitative mapping of alkaline phosphatase in the brain of the rhesus monkey. *JNeurochem* 13(3): 197-203.
- Fritschy JM, Kiener T, Bouilleret V, Loup F (1999). GABAergic neurons and GABA(A)-receptors in

- temporal lobe epilepsy. *NeurochemInt* 34(5): 435-445.
- Fukuyama Y, Kagawa K, Tanaka K (1979). A genetic study of febrile convulsions. *EurNeurol* 18 (3): 166-182.
- Garey LJ (1994). Brodmann's "Localisation in the cerebral cortex". *Brodmann's "Localisation in the cerebral cortex"*. Smith-Gordon: London.
- Gilbert CD (1983). Microcircuitry of the visual cortex. *AnnuRevNeurosci* 6: 217-247.
- Gloor P (1991). Mesial temporal sclerosis: historical background and an overview from a modern perspective. In: Luders H (ed). *Epilepsy surgery*. Raven Press: New York, pp 689-703.
- Golgi C (1873). Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazzette Medica Italiana-Lombardia* 6 (33): 244-246.
- Gomori G (1939). Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *ProcSocExpBiolMed* 42: 23-28.
- Gonchar YA, Johnson PB, Weinberg RJ (1995). GABA-immunopositive neurons in rat neocortex with contralateral projections to S-I. *Brain Res* 697 (1-2): 27-34.
- Gray EG (1959a). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *JAnat* 93: 420-433.
- Gray EG (1959b). Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* 183(4675): 1592-1593.
- Gross CG (1993). Hippocampus minor and man's place in nature: a case study in the social construction of neuroanatomy. *Hippocampus* 3(4): 403-415.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B (1988). The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96(10): 857-881.
- Ham AW (1975). *Tratado de Histología* Editora Importecnica, S.A.: Madrid.
- Hellsten J, West MJ, Arvidsson A, Ekstrand J, Jansson L, Wennstrom M, Tingstrom A (2005). Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *BiolPsychiatry* 58(11): 871-878.
- Hennessy MJ, Elwes RD, Binnie CD, Polkey CE (2000). Failed surgery for epilepsy. A study of persistence and recurrence of seizures following temporal resection. *Brain* 123 Pt 12: 2445-2466.
- Hildebrandt M, Amann K, Schroder R, Pieper T, Kolodziejczyk D, Holthausen H, Buchfelder M, Stefan H, Blumcke I (2008). White matter angiopathy is common in pediatric patients with intractable focal epilepsies. *Epilepsia* 49(5): 804-815.
- Hildebrandt M, Pieper T, Winkler P, Kolodziejczyk D, Holthausen H, Blumcke I (2005). Neuropathological spectrum of cortical dysplasia in children with severe focal epilepsies. *Acta Neuropathol* 110(1): 1-11.
- Ho SS, Kuzniecky RI, Gilliam F, Faught E, Morawetz R (1998). Temporal lobe developmental malformations and epilepsy: dual pathology and bilateral hippocampal abnormalities. *Neurology* 50 (3): 748-754.
- Honavar M, Meldrum BS (1997). Epilepsy. In: Graham DI, Lantos PL (eds). *Greenfield's Neuropathology*. Arnold: London. Vol 6th, pp 931-971.
- Houser CR (1990). Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 535(2): 195-204.

BIBLIOGRAFÍA

- Houser CR (1992). Morphological changes in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy ResSuppl* 7: 223-234.
- Houser CR (1999). Neuronal loss and synaptic reorganization in temporal lobe epilepsy. *AdvNeurol* 79: 743-761.
- Houser CR, Esclapez M (1996). Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res* 26(1): 207-218.
- Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV (1990). Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *JNeurosci* 10(1): 267-282.
- Houser CR, Swartz BE, Walsh GO, gado-Escueta AV (1992). Granule cell disorganization in the dentate gyrus: possible alterations of neuronal migration in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy ResSuppl* 9: 41-48.
- Houser CR, Vaughn JE, Hendry SHC, Jones EG, Peters A, Jone EG (1984). GABA neurons in the cerebral cortex. *Cerebral Cortex. Functional properties of Cortical Cells*. Plenum Press: New York, pp 63-89.
- Iadecola C (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *NatRev Neurosci* 5(5): 347-360.
- Iadecola C, Nedergaard M (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *NatNeurosci* 10(11): 1369-1376.
- Insausti R, Amaral DG, Cowan WM (1987). The entorhinal cortex of the monkey: II. Cortical afferents. *JComp Neurol* 264(3): 356-395.
- Insausti R, Tunon T, Sobreviela T, Insausti AM, Gonzalo LM (1995). The human entorhinal cortex: a cytoarchitectonic analysis. *JComp Neurol* 355(2): 171-198.
- Jacobs KM, Graber KD, Kharazia VN, Parada I, Prince DA (2000). Postlesional epilepsy: the ultimate brain plasticity. *Epilepsia* 41 Suppl 6: S153-S161.
- Kalnins RM, McIntosh A, Saling MM, Berkovic SF, Jackson GD, Briellmann RS (2004). Subtle microscopic abnormalities in hippocampal sclerosis do not predict clinical features of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 45(8): 940-947.
- Kasantikul V, Brown WJ, Oldendorf WH, Crandall PC (1983). Ultrastructural parameters of limbic microvasculature in human psychomotor epilepsy. *ClinNeuropathol* 2(4): 171-178.
- Kasper BS, Stefan H, Buchfelder M, Paulus W (1999). Temporal lobe microdysgenesis in epilepsy versus control brains. *JNeuropatholExpNeurol* 58(1): 22-28.
- Kasper BS, Stefan H, Paulus W (2003). Microdysgenesis in mesial temporal lobe epilepsy: a clinicopathological study. *AnnNeurol* 54(4): 501-506.
- Klausberger T, Somogyi P (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321(5885): 53-57.
- Koepp MJ, Richardson MP, Brooks DJ, Poline JB, Van PW, Friston KJ, Duncan JS (1996). Cerebral benzodiazepine receptors in hippocampal sclerosis. An objective in vivo analysis. *Brain* 119 (Pt 5): 1677-1687.
- Kuzniecky R, Ho SS, Martin R, Faught E, Morawetz R, Palmer C, Gilliam F (1999). Temporal lobe developmental malformations and hippocampal sclerosis: epilepsy surgical outcome. *Neurology* 52 (3): 479-484.
- Langtry HD, Wastaff WA (1997). Management of epilepsy: defining the role of lamotrigene. *DisMagabe Health Outcomes* 1: 254-270.
- Lattera J, Goldstein GW (2000). Ventricular Organization of Cerebrospinal Fluid: Blood-Brain

- Barrier, Brain Edema, and Hydrocephalus. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds). *Principles of neural science*. Vol Fourth, pp 1288-1300.
- Lawrenson JG, Reid AR, Finn TM, Orte C, Allt G (1999). Cerebral and pial microvessels: differential expression of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase. *AnatEmbryol(Berl)* 199(1): 29-34.
- Lazzari M, Franceschini V (2000). Structural and spatial organisation of brain parenchymal vessels in the lizard, *Podarcis sicula*: a light, transmission and scanning electron microscopy study. *JAnat* 197 (Pt 2): 167-175.
- Lehmann TN, Gabriel S, Kovacs R, Eilers A, Kivi A, Schulze K, Lanksch WR, Meencke HJ, Heinemann U (2000). Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia* 41 Suppl 6: S190-S194.
- Leite JP, Neder L, Arisi GM, Carlotti CG, Jr., Assirati JA, Moreira JE (2005). Plasticity, synaptic strength, and epilepsy: what can we learn from ultrastructural data? *Epilepsia* 46 Suppl 5: 134-141.
- Levesque MF, Nakasato N, Vinters HV, Babb TL (1991). Surgical treatment of limbic epilepsy associated with extrahippocampal lesions: the problem of dual pathology. *JNeurosurg* 75(3): 364-370.
- Lewis FT (1923). The significance of the term hippocampus. *JComp Neurol* 35: 213-230.
- Li LM, Cendes F, Andermann F, Watson C, Fish DR, Cook MJ, Dubeau F, Duncan JS, Shorvon SD, Berkovic SF, Free S, Olivier A, Harkness W, Arnold DL (1999). Surgical outcome in patients with epilepsy and dual pathology. *Brain* 122 (Pt 5): 799-805.
- Lin LH, Sahai AK, Rockland KS, Talman WT (2000). The distribution of neuronal nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii of the squirrel monkey. *Brain Res* 856(1-2): 84-92.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003). Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *NatRev Neurosci* 4(5): 399-415.
- Lokkegaard A, Nyengaard JR, West MJ (2001). Stereological estimates of number and length of capillaries in subdivisions of the human hippocampal region. *Hippocampus* 11(6): 726-740.
- Lorente de Nó R (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *JPsycholNeurol* 45: 381-442.
- Löscher W (1997). Animal models of intractable epilepsy. *ProgNeurobiol* 53(2): 239-258.
- Lothman EW, Collins RC (1981). Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Res* 218(1-2): 299-318.
- Loup F, Picard F, Andre VM, Kehrli P, Yonekawa Y, Wieser HG, Fritschy JM (2006). Altered expression of alpha3-containing GABAA receptors in the neocortex of patients with focal epilepsy. *Brain* 129 (Pt 12): 3277-3289.
- Lund JS, Peters A, Jones EG (1984). Spiny stellate neurons. *Cellular components of the cerebral cortex*. Plenum Press: New York, pp 255-308.
- Lynd-Balta E, Pilcher WH, Joseph SA (1996). Distribution of AMPA receptor subunits in the hippocampal formation of temporal lobe epilepsy patients. *Neuroscience* 72(1): 15-29.
- Manocha SL (1970). Histochemical distribution of alkaline and acid phosphatase and adenosine triphosphatase in the brain of squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Histochemie* 21(3): 221-235.
- Marco P, DeFelipe J (1997). Altered synaptic circuitry in the human temporal neocortex removed from epileptic patients. *ExpBrain Res* 114(1): 1-10.
- Marco P, Sola RG, Pulido P, Alijarde MT, Sanchez A, Cajal S, DeFelipe J (1996). Inhibitory neurons in the human

BIBLIOGRAFÍA

- epileptogenic temporal neocortex. An immunocytochemical study. *Brain* 119 (Pt 4): 1327-1347.
- Marinkovic S, Milisavljevic M, Puskas L (1992). Microvascular anatomy of the hippocampal formation. *SurgNeurol* 37(5): 339-349.
- Marusic P, Tomasek M, Krsek P, Krijtova H, Zarubova J, Zamecnik J, Mohapl M, Benes V, Tichy M, Komarek V (2007). Clinical characteristics in patients with hippocampal sclerosis with or without cortical dysplasia. *EpilepticDisord* 9 Suppl 1: S75-S82.
- Masukawa LM, O'Connor WM, Burdette LJ, McGonigle P, Sperling MR, O'Connor MJ, Uruno K (1997). Mossy fiber reorganization and its possible physiological consequences in the dentate gyrus of epileptic humans. *AdvNeurol* 72: 53-68.
- Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD, Leite JP (2002). Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *ProgBrain Res* 135: 237-251.
- Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Leite JP (1995a). Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *JNeurosci* 15(5 Pt 2): 3990-4004.
- Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Melendez M, Levesque MF (1995b). The pathophysiologic relationships between lesion pathology, intracranial ictal EEG onsets, and hippocampal neuron losses in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 21(2): 133-147.
- Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK (1995c). The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain* 118 (Pt 1): 105-118.
- Mayanagi Y, Watanabe E, Kaneko Y (1996). Mesial temporal lobe epilepsy: clinical features and seizure mechanism. *Epilepsia* 37 Suppl 3: 57-60.
- McKinney RA, Debanne D, Gahwiler BH, Thompson SM (1997). Lesion-induced axonal sprouting and hyperexcitability in the hippocampus in vitro: implications for the genesis of posttraumatic epilepsy. *NatMed* 3(9): 990-996.
- Megías M, Emri Z, Freund TF, Gulyas AI (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 102(3): 527-540.
- Meldrum BS (1988). Pathophysiology of chronic epilepsy. In: Trimble MR (ed). *Chronic Epilepsy. Its prognosis and management*. John Wiley: Chinchester.
- Meldrum BS, Bruton CJ (1992). Epilepsy. In: Adams J, Duchen LW (eds). *Greenfield's Neuropathology*. Arnold: London. Vol 5th, pp 1246-1283.
- Meldrum BS, Vigouroux RA, Rage P, Brierley JB (1973). Hippocampal lesions produced by prolonged seizures in paralyzed artificially ventilated baboons. *Experientia* 29(5): 561-563.
- Mello LE, Cavaleiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM (1993). Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34(6): 985-995.
- Meyer A, Falconer MA, Beck E (1954). Pathological findings in temporal lobe epilepsy. *JNeurolNeurosurgPsychiatry* 17(4): 276-285.
- Meynert T (1867). Studien uber das pathologisch-anatomische material der Wiener Irren-Anstalt. *Vierteljahrssch* 3: 381-402.
- Miles R, Poncer JC (1996). Paired recordings from neurones. *CurrOpinNeurobiol* 6(3): 387-394.
- Miller LA, McLachlan RS, Bouwer MS, Hudson LP, Munoz DG (1994). Amygdalar sclerosis: preoperative indicators and outcome after temporal lobectomy. *JNeurolNeurosurgPsychiatry* 57(9): 1099-1105.

- Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *ProgNeurobiol* 73(1): 1-60.
- Mouritzen-Dam A (1980). Epilepsy and neuron loss in the hippocampus. *Epilepsia* 21(6): 617-629.
- Mouritzen-Dam A (1982). Hippocampal neuron loss in epilepsy and after experimental seizures. *Acta Neurol Scand* 66: 601-642.
- Munari C, Berta E, Tassi L, Lo RG, Cardinale F, Francione S, Kahane P, Benabid AL (2000). Analysis of failures and reoperations in resective epilepsy surgery. *AdvNeurol* 84: 605-614.
- Muñoz A, Arellano JI, DeFelipe J (2002). GABABR1 receptor protein expression in human mesial temporal cortex: changes in temporal lobe epilepsy. *JComp Neurol* 449(2): 166-179.
- Muñoz A, Mendez P, DeFelipe J, Alvarez-Leefmans FJ (2007). Cation-chloride cotransporters and GABA-ergic innervation in the human epileptic hippocampus. *Epilepsia* 48(4): 663-673.
- Nadler JV, Perry BW, Gentry C, Cotman CW (1981). Fate of the hippocampal mossy fiber projection after destruction of its postsynaptic targets with intraventricular kainic acid. *JComp Neurol* 196(4): 549-569.
- Nakasato N, Levesque MF, Babb TL (1992). Seizure outcome following standard temporal lobectomy: correlation with hippocampal neuron loss and extrahippocampal pathology. *JNeurosurg* 77(2): 194-200.
- Narisawa S, Froehlander N, Millan JL (1997). Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Developmental Dynamics* 208(3): 432-446.
- Narisawa S, Wennberg C, Luis Millan J (2001). Abnormal vitamin B 6 metabolism in alkaline phosphatase knock-out mice causes multiple abnormalities, but not the impaired bone mineralization. *The Journal of Pathology* 193(1): 125-133.
- Nelson KB, Ellenberg JH (1976). Predictors of epilepsy in children who have experienced febrile seizures. *NEnglJMed* 295(19): 1029-1033.
- Nelson KB, Ellenberg JH (1990). Prenatal and perinatal antecedents of febrile seizures. *AnnNeurol* 27(2): 127-131.
- Nishio S, Morioka T, Hisada K, Fukui M (2000). Temporal lobe epilepsy: a clinicopathological study with special reference to temporal neocortical changes. *NeurosurgRev* 23(2): 84-89.
- Nishio S, Morioka T, Kawamura T, Fukui K, Nonaka H, Matsushima M (2001). Corpora amylacea replace the hippocampal pyramidal cell layer in a patient with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 42(7): 960-962.
- Nunes ML, Mugnol F, Bica I, Fiori RM (2002). Pyridoxine-dependent seizures associated with hypophosphatasia in a newborn. *JChild Neurol* 17 (3): 222-224.
- Nusser Z, Hajos N, Somogyi P, Mody I (1998). Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* 395(6698): 172-177.
- Oby E, Janigro D (2006). The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia* 47(11): 1761-1774.
- Ojeman GA, Spencer DD, Spencer SS (1991). Temporal lobectomy tailored to electrocorticography and functional mapping. *Surgery for epilepsy*. Blackwell Scientific Publication: Boston, pp 137-148.
- Olry R, Haines DE (1998). Cerebral mythology: a skull stuffed with gods. (Neurowords 3). *Hist Neurosci* 7(1): 82-83.
- Olsen RW, Bureau M, Houser CR, Delgado-Escueta

BIBLIOGRAFÍA

- AV, Richards JG, Mohler H (1992). GABA/benzodiazepine receptors in human focal epilepsy. *Epilepsy Res Suppl* 8: 383-391.
- Orte C, Lawrenson JG, Finn TM, Reid AR, Allt G (1999). A comparison of blood-brain barrier and blood-nerve barrier endothelial cell markers. *AnatEmbryol(Berl)* 199(6): 509-517.
- Palmini A, Luders HO (2002). Classification issues in malformations caused by abnormalities of cortical development. *NeurosurgClinNam* 13(1): 1-16, vii.
- Palmini A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, Jackson G, Luders HO, Prayson R, Spreafico R, Vinters HV (2004). Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology* 62(6 Suppl 3): S2-S8.
- Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2003). Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26(4): 199-206.
- Peachey LD (1958). Thin sections. I. A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy. *JBiophysBiochemCytol* 4(3): 233-242.
- Pedre L, Suarez OS, Chacón ML, Maeso IG, Djaz BE, del Busto JEB, Fuentes NP, Piñero BP, Arrieta LR (2008). Muerte neuronal en la neocorteza de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal resistente a fármacos. *Neurología* 23: 3-13.
- Penfield W, Jasper H (1954). *Epilepsy and the functional anatomy of the human brain* Little Brown&Co: Boston, Mass.
- Pérez Y, Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC (1996). Axonal sprouting of CA1 pyramidal cells in hyperexcitable hippocampal slices of kainate-treated rats. *EurJNeurosci* 8(4): 736-748.
- Peters A, Jones EG (1984). Classification of cortical neurons. *Cerebral Cortex*. Plenum Press: New York, pp 107-121.
- Peters A, Palay SL, Webster HD (1991). *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells* Oxford University Press: New York.
- Peters A, Sethares C, Harriman KM (1990). Different kinds of axon terminals forming symmetric synapses with the cell bodies and initial axon segments of layer II/III pyramidal cells. II. Synaptic junctions. *JNeurocytol* 19(4): 584-600.
- Prayson RA, Reith JD, Najm IM (1996). Mesial temporal sclerosis. A clinicopathologic study of 27 patients, including 5 with coexistent cortical dysplasia. *ArchPatholLab Med* 120(6): 532-536.
- Prince DA, Salin P, Tseng GF, Hoffman S, Parada I (1997). Axonal sprouting and epileptogenesis. *AdvNeurol* 72: 1-8.
- Pulido P, Garcia de Sola R (1996). Localización anatómo-funcional en la corteza cerebral. Aplicación de un sistema de integración de imágenes como guía para la resección de lesiones cerebrales corticales. *Rev Neurol* 24 (Supl 1): S5-S61.
- Radhakrishnan A, Radhakrishnan K, Radhakrishnan VV, Mary PR, Kesavadas C, Alexander A, Sarma PS (2007). Corpora amylacea in mesial temporal lobe epilepsy: clinico-pathological correlations. *Epilepsy Res* 74(2-3): 81-90.
- Ravizza T, Noe F, Zardoni D, Vaghi V, Siffringer M, Vezzani A (2008). Interleukin Converting Enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL-1beta production. *NeurobiolDis*.
- Raymond AA, Fish DR, Stevens JM, Cook MJ, Sisodiya SM, Shorvon SD (1994). Association of hippocampal sclerosis with cortical dysgenesis in patients with epilepsy. *Neurology* 44(10): 1841-1845.
- Ribak CE, Seress L, Weber P, Epstein CM, Henry TR, Bakay RA (1998). Alumina gel injections into the temporal lobe of rhesus monkeys cause complex partial seizures and morphological changes found in human temporal lobe epilepsy. *JComp Neurol* 401(2): 266-290.

- Rickert CH (2006). Cortical dysplasia: neuropathological aspects. *Childs Nerv Syst* 22(8): 821-826.
- Rigau V, Morin M, Rousset MC, de BF, Lebrun A, Coubes P, Picot MC, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Crespel A, Lerner-Natoli M (2007). Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain* 130(Pt 7): 1942-1956.
- Rosene DL, Van Hoesen GW (1987). The hippocampal formation of the primate brain. In: Jones EG, Peters A (eds). *Cerebral Cortex*. Plenum Press: New York, pp 345-456.
- Sagar HJ, Oxbury JM (1987). Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy: correlation with early childhood convulsions. *Ann Neurol* 22(3): 334-340.
- Salanova V, Markand O, Worth R (2004). Temporal lobe epilepsy: analysis of patients with dual pathology. *Acta Neurol Scand* 109(2): 126-131.
- Sánchez del Pino MM, Hawkins RA, Peterson DR (1995). Biochemical discrimination between luminal and abluminal enzyme and transport activities of the blood-brain barrier. *JBiolChem* 270(25): 14907-14912.
- Schaffer K (1892). Beitrag zur histologie der ammonshornformation. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 39: 611-632.
- Schwarzer C, Tsunashima K, Wanzenböck C, Fuchs K, Sieghart W, Sperk G (1997). GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus II: altered distribution in kainic acid-induced temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 80(4): 1001-1017.
- Schwob JE, Fuller T, Price JL, Olney JW (1980). Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 5(6): 991-1014.
- Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, Bechmann I, Tomkins O, Heinemann U, Friedman A (2004). Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *JNeurosci* 24(36): 7829-7836.
- Shepherd GM (1974). *The synaptic organization of the brain* Oxford university press: New York.
- Siegel AM, Wieser HG, Wichmann W, Yasargil GM (1990). Relationships between MR-imaged total amount of tissue removed, resection scores of specific mediobasal limbic subcompartments and clinical outcome following selective amygdalo hippocampectomy. *Epilepsy Res* 6(1): 56-65.
- Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M (2003). Signaling at the gliovascular interface. *JNeurosci* 23(27): 9254-9262.
- Sloviter RS (1983). "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies. *Brain Res Bull* 10(5): 675-697.
- Sloviter RS (1999). Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization. *Epilepsia* 40 Suppl 1: S34-S39.
- Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD (1991). Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *JComp Neurol* 308(3): 381-396.
- Sola RG, Hernando-Requejo V, Pastor J, Garcia-Navarrete E, DeFelipe J, Alijarde MT, Sanchez A, Dominguez-Gadea L, Martin-Plasencia P, Maestu F, Felipe-Oroquieta J, Ramon-Cajal S, Pulido-Rivas P (2005). Pharmacoresistant temporal-lobe epilepsy. Exploration with foramen ovale electrodes and surgical outcomes. *Rev Neurol* 41(1): 4-16.
- Spencer DD, Spencer SS (1994). Hippocampal resections and the use of human tissue in defining temporal lobe epilepsy syndromes. *Hippocampus* 4(3): 243-249.
- Spencer SS (1998). Substrates of localization-related epilepsies: biologic implications of localizing

BIBLIOGRAFÍA

- findings in humans. *Epilepsia* 39(2): 114-123.
- Sperk G (1994). Kainic acid seizures in the rat. *ProgNeurobiol* 42(1): 1-32.
- Stafstrom CE (2005). The role of the subiculum in epilepsy and epileptogenesis. *Epilepsy Curr* 5(4): 121-129.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L (1989). Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *AnnNeurol* 26(3): 321-330.
- Sutula T, He XX, Cavazos J, Scott G (1988). Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 239(4844): 1147-1150.
- Sutula T, Zhang P, Lynch M, Sayin U, Golarai G, Rod R (1998). Synaptic and axonal remodeling of mossy fibers in the hilus and supragranular region of the dentate gyrus in kainate-treated rats. *JComp Neurol* 390(4): 578-594.
- Sutula TP (1990). Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia* 31 Suppl 3: S45-S54.
- Sutula TP, Cavazos JE, Woodard AR (1994). Long-term structural and functional alterations induced in the hippocampus by kindling: implications for memory dysfunction and the development of epilepsy. *Hippocampus* 4(3): 254-258.
- Szabadics J, Varga C, Molnar G, Olah S, Barzo P, Tamas G (2006). Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 311(5758): 233-235.
- Tassi L, Colombo N, Garbelli R, Francione S, Lo RG, Mai R, Cardinale F, Cossu M, Ferrario A, Galli C, Bramerio M, Citterio A, Spreafico R (2002). Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain* 125(Pt 8): 1719-1732.
- Thom M, Holton JL, D'Arrigo C, Griffin B, Beckett A, Sisodiya S, Alexiou D, Sander JW (2000). Microdysgenesis with abnormal cortical myelinated fibres in temporal lobe epilepsy: a histopathological study with calbindin D-28-K immunohistochemistry. *NeuropatholApplNeurobiol* 26(3): 251-257.
- Thom M, Martinian L, Sen A, Cross JH, Harding BN, Sisodiya SM (2005). Cortical neuronal densities and lamination in focal cortical dysplasia. *Acta Neuropathol* 110(4): 383-392.
- Thom M, Sisodiya SM, Beckett A, Martinian L, Lin WR, Harkness W, Mitchell TN, Craig J, Duncan J, Scaravilli F (2002). Cytoarchitectural abnormalities in hippocampal sclerosis. *JNeuropatholExpNeurol* 61 (6): 510-519.
- Tomkins O, Shelef I, Kaizerman I, Misk A, Afawi Z, Eliushin A, Gidon M, Cohen A, Zumsteg D, Friedman A (2007). Blood-Brain Barrier Disruption in Post-Traumatic Epilepsy. *JNeurolNeurosurgPsychiatry*.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *BehavBrain Res* 9(3): 315-335.
- Van Paesschen W, Revesz T, Duncan JS (1997). Corpora amylacea in hippocampal sclerosis. *JNeurol NeurosurgPsychiatry* 63(4): 513-515.
- Van Vliet EA, da Costa AS, Redeker S, van SR, Aronica E, Gorter JA (2007). Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 130(Pt 2): 521-534.
- Verity CM (1998). Do seizures damage the brain? The epidemiological evidence. *ArchDisChild* 78(1): 78-84.
- Verity CM, Greenwood R, Golding J (1998). Long-term intellectual and behavioral outcomes of children with febrile convulsions. *NEnglJMed* 338(24): 1723-1728.

- Vestergaard M, Christensen J (2009). Register-based studies on febrile seizures in Denmark. *Brain Dev.*
- Viteri C, Iriarte J (1997). *Epilepsia y otros trastornos convulsivos* Masson: Barcelona, 1969-1983pp.
- Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, Guilarte TR, Coburn SP, MacGregor GR (1995). Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nature Genetics* 11: 45-51.
- White EL (1989). *Cortical circuits: synaptic organization of the cerebral cortex* Birkhauser Boston: Boston.
- Whyte MP, Mahuren JD, Fedde KN, Cole FS, McCabe ER, Coburn SP (1988). Perinatal hypophosphatasia: tissue levels of vitamin B6 are unremarkable despite markedly increased circulating concentrations of pyridoxal-5'-phosphate. Evidence for an ectoenzyme role for tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *J Clin Invest* 81(4): 1234-1239.
- Wieser HG, Engel J, Jr., Williamson PD, Babb TL, Gloor P (1993). Surgically remediable temporal lobe syndromes. *Surgical treatment of epilepsies*. Raven Press: New York, pp 49-63.
- Wieser HG, Ortega M, Friedman A, Yonekawa Y (2003). Long-term seizure outcomes following amygdalo hippocampectomy. *JNeurosurg* 98(4): 751-763.
- Winslow (1732). *Exposition anatomique de la structure du corps humain*: Paris, 619pp.
- Witter MP, Amaral DG (1991). Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *JComp Neurol* 307(3): 437-459.
- Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH, Lohman AH (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *ProgNeurobiol* 33(3): 161-253.
- Wittner L, Eross L, Szabo Z, Toth S, Czirjak S, Halasz P, Freund TF, Magloczky ZS (2002). Synaptic reorganization of calbindin-positive neurons in the human hippocampal CA1 region in temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 115(3): 961-978.
- Wolf HK, Campos MG, Zentner J, Hufnagel A, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD (1993a). Surgical pathology of temporal lobe epilepsy. Experience with 216 cases. *JNeuropatholExpNeurol* 52(5): 499-506.
- Wolf HK, Zentner J, Hufnagel A, Campos MG, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD (1993b). Surgical pathology of chronic epileptic seizure disorders: experience with 63 specimens from extratemporal corticectomies, lobectomies and functional hemispherectomies. *Acta Neuropathol* 86(5): 466-472.
- Yilmazer-Hanke DM, Wolf HK, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD, Blumcke I (2000). Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *JNeuropatholExpNeurol* 59(10): 907-920.
- Ying Z, Babb TL, Comair YG, Bushey M, Touhalisky K (1998). Increased densities of AMPA GluR1 subunit proteins and presynaptic mossy fiber sprouting in the fascia dentata of human hippocampal epilepsy. *Brain Res* 798(1-2): 239-246.
- York MK, Rettig GM, Grossman RG, Hamilton WJ, Armstrong DD, Levin HS, Mizrahi EM (2003). Seizure control and cognitive outcome after temporal lobectomy: a comparison of classic Ammon's horn sclerosis, atypical mesial temporal sclerosis, and tumoral pathologies. *Epilepsia* 44(3): 387-398.
- Zhang N, Houser CR (1999). Ultrastructural localization of dynorphin in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy: a study of reorganized mossy fiber synapses. *JComp Neurol* 405(4): 472-490.

